# Environmental Protection Series

Environment Canada Environnement

Report (Canada. Environment Canada)

No: 1 Date: 900700 RM/14

TD 182 R46
ODFF

2039102N
EXC 1

## Biological Test Method:

## Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to *Daphnia magna*

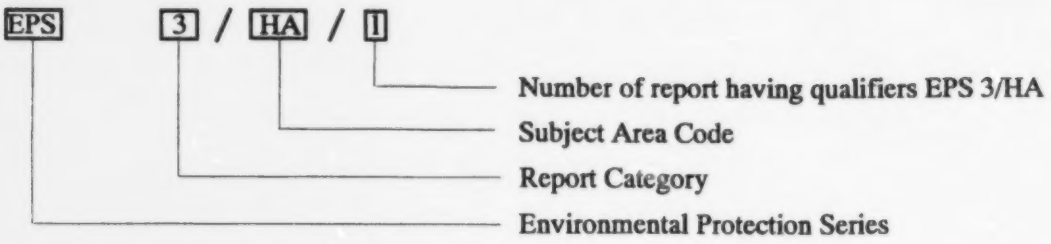
**Reference Method EPS 1/RM/14**
**July 1990**

Canada

Environment Canada Environnement Canada

**ENVIRONMENTAL PROTECTION SERIES**

**Sample Number:**




**Categories**

1 Regulations/Guidelines/Codes of Practice
2 Problem Assessments, and Control Options
3 Research and Technology Development
4 Literature Reviews
5 Surveys
6 Social, Economic and Environmental Impact Assessments
7 Surveillance
8 Policy Proposals & Statements
9 Manuals

**Subject Areas**

AG Agriculture
AN Anaerobic Technology
AP Airborne Pollutants
AT Aquatic Toxicity
CC Commercial Chemicals
CE Consumers and the Environment
CI Chemical Industries
FA Federal Activities
FP Food Processing
HA Hazardous Wastes
IC Inorganic Chemicals
MA Marine Pollution
MM Mining and Ore Processing
NR Northern and Rural Regions
PF Paper and Fibres
PG Power Generation
PN Petroleum and Natural Gas
RA Refrigeration and Air Conditioning
RM Reference Methods
SF Surface Finishing
SP Oil and Chemical Spills
SRM Standard Reference Methods
TS Transportation Systems
TX Textiles
UP Urban Pollution
WP Wood Protection/Preservation

New subject areas and codes are introduced as they become necessary. A list of EPS reports may be obtained from Environmental Protection Publications, Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada, K1A 0H3

*Think Recycling!*

*Pensez à recycler!*

***This publication is printed on paper containing recovered waste.***

# Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to *Daphnia magna*

Environmental Protection
Conservation and Protection
Environment Canada

Reference Method EPS 1/RM/14
July 1990

91-02030/

**Canadian Cataloguing in Publication Data**

Main entry under title:

Biological test method. Reference method for determining acute lethality of effluents to *Daphnia magna*

(Reference method ; EPS 1/RM/14)
Text in English and French with French text on inverted pages.
Title on added t.p.: Méthode d'essai biologique, méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez *Daphnia magna*.
Includes bibliographical references.
ISBN 0-662-57747-7
DSS cat. no. En49-24/1-14

1. Daphnia -- Mortality -- Testing -- Standards -- Canada. 2. Daphnia -- Microbiology -- Standards -- Canada. 3. Effluent quality -- Testing -- Standards -- Canada. I. Canada. Environmental Protection Directorate. II. Canada. Environment Canada. III. Series: Report (Canada. Environment Canada) ; EPS 1/RM/14. IV. Title. V. Title: Reference method for determining acute lethality of effluents to *Daphnia magna*.

QL444.B83 1990 595.3'2 C90-098699-9E

©Minister of Supply and Services Canada 1990
Catalogue No. En 49-24/1-14
ISBN 0-662-57747-7
BEAUREGARD PRINTERS LIMITED

# Readers' Comments

Comments regarding the content of this report should be addressed to:

Gary Sergy
Technology Development Branch
Environment Canada
No. 210, 4999-98 Avenue
Edmonton, Alberta
T6B 2X3

Richard Scroggins
Industrial Programs Branch
Environment Canada
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

Mention of trade names in this report does not constitute endorsement by Environment Canada. Other products with similar value are available.

# Abstract

*Explicit standard or reference methods for determining the acute lethal toxicity of effluents to the crustacean "waterflea"* Daphnia magna *are described in this report. Specific instructions for performing and reporting acute lethality tests with samples of effluent are given, and the guidance provided in the generic methodology document "Acute Lethality Test Using* Daphnia *spp". is built upon (Environment Canada, 1990a).*

*Methods are given for: 1). a single-concentration test, with full-strength effluent unless otherwise specified; 2). a multi-concentration test to determine the median lethal concentration ($LC_{50}$); and 3). a test with a reference toxicant. Instructions are included on holding and culturing the daphnid crustaceans, facilities and water supply, handling and storage of samples, preparation of solutions, test conditions, observations to be made, endpoints with methods of calculation, and the use of reference toxicants.*

# Table of Contents

**Abstract** . . . . . v
**Terminology** . . . . . ix
**Acknowledgements** . . . . . xii

*Section 1*
**Introduction** . . . . . 1

*Section 2*
**Culturing Organisms** . . . . . 2
**2.1** Maintaining Cultures . . . . . 2
**2.2** Water . . . . . 3
**2.3** Physicochemical Conditions . . . . . 3

*Section 3*
**Facilities** . . . . . 4

*Section 4*
**General Procedure for Determining Acute Lethality of Effluent** . . . . . 5
**4.1** Sample Labelling, Transport, and Storage . . . . . 5
**4.2** Test Conditions . . . . . 5
**4.3** Preparing Test Solutions . . . . . 6
**4.4** Beginning the Test . . . . . 6
**4.5** Observations and Measurements . . . . . 7

Section 5
**Procedure for Testing a Single Concentration of Effluent** . . . . . 8

*Section 6*
**Procedure for Determining an $LC_{50}$ for Effluent** . . . . . 9

*Section 7*
**Procedure for Tests With a Reference Toxicant** . . . . . 10

*Section 8*
**Reporting Requirements** . . . . . 11
**8.1** Data to be Reported . . . . . 11
**8.1.1** Effluent . . . . . 11
**8.1.2** Test Facilities and Conditions . . . . . 11
**8.1.3** Results . . . . . 12
**8.2** Data to be Held on File . . . . . 12
**8.2.1** Effluent . . . . . 12

**8.2.2 Test Facilities and Conditions . . . . . 13**
**8.2.3 Results . . . . . 13**

**References . . . . . 15**

*Appendix*
**List of Members of the Inter-Governmental Aquatic Toxicity Group and Conservation & Protection Regional and Headquarters' Office Addresses . . . . . 17**

# Terminology

The following definitions are given in the context of this report, and additional definitions in the detailed companion document (Environment Canada, 1990a) apply here.

*Acute* means happening within a short period of time, usually taken as ≤ 48-h for daphnids.

*Conductivity* is a numerical expression of the ability of an aqueous solution to carry electric current. This depends on concentrations of ions in solution, their valence and mobility, and on temperature. Conductivity is reported as millisiemens/metre, an SI unit (Système international d'unités), or as micromhos/cm (1 mS/m = 10 μmhos/cm).

*Control* is a treatment in an investigation that duplicates all the factors that might affect results, except the specific condition being studied. In toxicity tests, the control must duplicate all conditions in the exposure treatment(s), but must contain no test material. The control is used to check for toxicity due to basic conditions such as quality of dilution water, or health and handling of organisms.

*Control/dilution* water is the water used for diluting the sample of effluent, or for the control test, or both.

*Culture* as a noun means the stock of animals that is raised under controlled conditions to produce test organisms through reproduction.

*Deionized* water has been passed through resin columns to remove ions from solution and thereby purify it.

*Dilution* water is that which is used to dilute a test material, to prepare different concentrations for the toxicity test.

*Effluent* means any liquid waste (e.g., industrial, municipal) discharged to the aquatic environment.

*$EC_{50}$* (median effective concentration) is the concentration of material in water estimated to cause a specified non-lethal or lethal effect in 50% of test organisms. The exposure-time and effect must be specified (e.g., "48-h $EC_{50}$ for immobilization").

*Ephippium* is an egg case that develops inside the postero-dorsal carapace of an adult female daphnid in response to adverse conditions. The eggs within have usually been fertilized through sexual reproduction.

*Hardness* is used to mean Total Hardness, the sum of calcium and magnesium concentrations, both expressed as calcium carbonate in milligrams per litre (mg/L).

*Immobility* is defined as the inability to swim during 15 seconds following gentle agitation of the test solution, even if antennal movement is still present.

*$LC_{50}$* (median lethal concentration) is the concentration of material (in this case effluent) in water that is estimated to be lethal to 50% of test organisms after a defined period of exposure (e.g., 48-h $LC_{50}$).

*Lethal* means causing death by direct action. Death of daphnids is defined here as the cessation of all visible signs of movement or activity, including second antennae, abdominal legs, and heartbeat as observed through a microscope.

*Lux* is a unit of illumination based on units per square metre. One lux = 0.0929 foot-candles and one foot-candle = 10.76 lux.

*Neonate* is a daphnid newly-released from the mother ("born") (i.e., a first-instar daphnid, 24 hours old or less).

*pH* is the negative logarithm of the activity of hydrogen ions in gram equivalents per litre. The pH value expresses the degree or intensity of both acidic and alkaline reactions on a scale from 0 to 14, with 7 representing neutrality, numbers less than 7 signifying increasingly greater acidic reactions, and numbers greater than 7 indicating increasingly basic or alkaline reactions.

*Photoperiod* is the duration of illumination and darkness within a 24-h day.

*Pre-treatment* means, in this report, treatment of a sample or dilution thereof, prior to exposure of daphnids.

*Reconstituted water* is deionized or glass-distilled water with reagent-grade chemicals added. The resultant synthetic fresh water is intended to be free of contaminants and have desired characteristics of pH and hardness.

*Reference toxicant* means a standard chemical used to assess the sensitivity of organisms and the validity of measurements of effluent toxicity.

*Salinity* means the total amount of solid material, in grams, dissolved in 1 kg of seawater. It is determined after all carbonates have been converted to oxides, all bromide and iodide have been replaced by chloride, and all organic matter has been oxidized. Salinity can also be measured directly using a salinity/conductivity meter or other means (APHA *et al.*, 1989). It is usually reported in parts per thousand (‰).

*Sublethal* means detrimental to an organism, but below the level which directly causes death within the test period.

*Toxicity* means the inherent potential or capacity of a material to cause adverse effects in living organisms.

# Acknowledgements

This report was shaped by the objectives, needs and comments of members of a subcommittee from Environmental Protection (EP): N. Bermingham (EP, Montreal); C. Blaise (EP, Longueuil); G. Coulombe (EP, Montreal); K. Doe (EP, Dartmouth); G. Elliott (EP, Edmonton); D. MacGregor (EP, Ottawa); J. MacLatchy (EP, Ottawa); W. Parker (EP, Dartmouth); D. Robinson (Fisheries & Oceans Canada, Ottawa); T. Ruthman (EP, Ottawa); R. Scroggins (EP, Ottawa); G. Sergy (EP, Edmonton); and R. Watts (EP, North Vancouver). Special thanks to provincial members of the Inter-Governmental Aquatic Toxicity Group (G. Joubert, ministère de l'Environnement du Québec; G. Westlake, Ontario Ministry of Environment; W. Young, Manitoba Environment and Public Safety; K. Lauten, Saskatchewan Environment and Public Safety; J. Somers, Alberta Environment; S. Horvath and G. van Aggelen, B.C. Ministry of Environment) who provided valuable input and comments. The contributions of the following external reviewers are acknowledged with sincere thanks: D. Vaughan (EP, Dartmouth); S. Wade (EP, Dartmouth); A. Beckett (EP, Edmonton); S. Yee (EP, North Vancouver); D. Moul (EP, North Vancouver); V. Zitko (Fisheries & Oceans Canada, St. Andrews); V. Cairns (Fisheries & Oceans Canada, Burlington); S. Samis (Fisheries & Oceans Canada, Vancouver); D. Poirier (Ontario Ministry of Environment, Rexdale); J. Moores (Alberta Environment, Vegreville); P. Martel (Pulp & Paper Research Inst. of Canada, Pointe Claire); Y. Bois (Technitrol · Eco Inc., Pointe Claire); C.R. Cook (E.B. Eddy Forest Products Ltd., Espanola); G. Craig (Beak Consultants Ltd., Brampton); and D. Bradley, D. Monteith, and J. Pickard (B.C. Research Corp., Vancouver). The laboratory testing support of Environment Canada (see Appendix) is also acknowledged.

Messrs. R. Scroggins and G. Sergy (EP, Environment Canada) acted as Scientific Authorities and provided technical input and guidance. The document was prepared by Don McLeay (McLeay Associates Ltd., West Vancouver, B.C.) and John Sprague (J.B. Sprague Associates Ltd., Guelph, Ontario).

*Section 1*

# Introduction

The procedures for an acute lethality test with *Daphnia magna*, specified by the Canadian government in pollution control regulations for various categories of industry, are given in this report. The procedures have their roots in methods for testing fish, published earlier by Environment Canada (e.g., EPS, 1980). The present report should be used in conjunction with a more extensive report which gives supporting rationale and additional details (Environment Canada, 1990a).

Many components of procedures in this report are similar to Canadian provincial methods (B.C. MOE, 1988; Poirier *et al.*, 1988; BNQ, 1990), U.S. methods (U.S. EPA, 1982; 1985a;b; Plotkin and Ram, 1983; ASTM, 1984; APHA *et al.*, 1989; Greene *et al.*, 1988), or international techniques (The Netherlands 1980; BHSC, 1982; OECD, 1981; ISO, 1982; IGATG, 1986). The contribution of those methods to all parts of the present report is acknowledged, and they are recommended as sources of supporting rationale. Procedures stipulated in this report should, however, be taken as the definitive ones for regulatory purposes.

The organism to be tested is the "waterflea" *Daphnia magna*, a small freshwater crustacean of the Order Cladocera. This daphnid is found in ponds and lakes of North America including western Canada, and is often an important component of aquatic communities. Daphnids are sensitive to a broad range of aquatic contaminants, and are used in toxicity tests internationally. They have the advantages of small size, short life cycles (which allow rapid tests), and relative ease of culture in laboratories.

Three basic procedures are described. One uses a single concentration of effluent (full strength unless otherwise specified) and a control, as would be suitable for a pass/fail test. A second procedure estimates the median lethal concentration ($LC_{50}$), or if necessary the median effective concentration for immobilization ($EC_{50}$) (i.e., it determines the degree of toxicity using several concentrations of effluent including full strength). A third procedure is a multi-concentration test with a reference toxicant, to assess the sensitivity of the test organisms to a standard toxicant and the precision of the data produced by the laboratory.

This test is to be used with effluents containing fresh water or having a salinity of $\leq$ 10 ‰, defined as conductivity $\leq$ 1550 mS/m at a temperature of 20 °C (1 mS/m = 10 micromhos/cm). Saline (>10 ‰) effluents discharging into fresh water should also be tested using this reference method and *D. magna* cultured in fresh water. Saline effluents discharging directly to seawater should be tested with a species authorized by the regional Environment Canada laboratory (see Appendix) and acclimated to seawater of similar salinity to that of the effluent.

*Section 2*

# Culturing Organisms

Specific requirements for culturing daphnids are given here, with further explanation in the more detailed document (Environment Canada 1990a).

Culturing techniques vary (U.S. EPA, 1982; 1985a; ASTM, 1984; Greene *et al.*, 1988; Poirier *et al.*, 1988) and the success of an approach may be judged by the criteria at the end of Section 2.1.

Neonate *Daphnia magna* must be used as test organisms.

## *2.1 Maintaining Cultures*

Glass aquaria, wide-mouthed jars, or beakers are recommended as culture vessels, each covered to exclude dust and reduce evaporation. Vessels and all accessories contacting the organisms, water, or culture media must be made of nontoxic materials (e.g., glass, stainless steel, Nalgene™, porcelain, polyethylene).

Water in each culture vessel should be almost completely replaced, at least weekly. The population of daphnids should be thinned at this time to twenty or fewer animals per litre.

Adult daphnids can be handled by gentle pouring from one container to another or by careful pipetting or siphoning. Neonates are susceptible to air entrapment, and minimal handling should be practised, with a disposable glass pipette cut off and fire-polished to provide a 5-mm opening. The tip of the pipette should be under the surface when daphnids are released. Transfers should be quick, with minimal carryover of "old" water to the new container.

At least one species of green alga must be used for feeding daphnids. It is strongly recommended that a mixture of at least two species be used. Additionally, a supplement such as yeast, Cerophyll™ and trout chow (see Appendix C of Environment Canada, 1990a) may be used. For the mixture of algae, one or more species of green alga with a diatom is beneficial; algae must be grown in a suitable culture medium (Environment Canada, 1990a).

Success of the daphnid culture may be judged by the following health criteria which must be met if the cultures are to be used in toxicity tests. Constant check should be maintained on the first item, and frequent checks on the next two.

- ephippia must not be present in the culture;
- age at delivery of first brood must be $\leq$ 12 days;
- females 2 to 5 weeks old must deliver an average of 15 or more neonates per brood; and
- no more than 25% of brood stock should die during the seven-day period prior to a test, assuming a culture of mixed ages.

The findings of a test with a reference toxicant (Section 7) give further indication of suitability of the culture for toxicity tests.

## 2.2 Water

Water to be used for culturing daphnids and as control/dilution water may be natural or reconstituted. For natural water, uncontaminated ground-, surface, or dechlorinated municipal water may be used provided that water hardness is within the 80 to 250 mg/L range. For reconstituted water, moderately-hard water (i.e., hardness 80 to 100 mg/L) is to be used.

If dechlorinated municipal water is to be used as culture/control/dilution water, it must be free of any harmful concentration of chlorine upon daphnid exposure. The target value for total residual chlorine in cultures, and for that in control/dilution water within test vessels is ≤ 0.002 mg/L (see Environment Canada, 1990a).

If moderately-hard (80 to 100 mg/L) reconstituted water is required, it may be prepared using any proven formulae that provide cultures of daphnids which meet the health criteria previously specified (see Environment Canada, 1990a). The pH of this reconstituted water must be in the 7.0 to 8.0 range; values of 7.4 to 7.8 are common (Environment Canada, 1990a). The addition of selenium and Vitamin $B_{12}$ to reconstituted water used for culturing organisms is necessary (see Environment Canada, 1990a). These nutrients may also be added to natural water, but only if they are required to assure that the health criteria are met.

The culture/control/dilution water must consistently support good survival, growth, and reproduction of daphnids. Chemical measurements should be made as often as necessary to document variation (at least hardness, pH, conductivity, dissolved oxygen, and total dissolved gases). The water must not be supersaturated with gases. Any supersaturation should be remedied (see Environment Canada, 1990a). A more detailed chemical analysis could be carried out periodically on other items listed by Environment Canada (1990a).

## 2.3 Physicochemical Conditions

Light intensity should not exceed 800 lux at the water surface, and the spectrum should be skewed towards the blue end (colour rendering index ≥ 90). Cool white fluorescent lights are suitable. Photoperiod must be a 16 ± 1 h light : 8 ± 1 h dark cycle.

Water temperature in the cultures must be 20 ± 2 °C for at least two weeks before animals are used in tests.

Dissolved oxygen in cultures should not fall below 60% of air saturation; this should be maintained by gentle aeration of each culture if necessary. The compressed air supplied to the culture should be filtered and free of oil, dust, and odours.

The pH of water used for culturing and as control/dilution water should be within the 6.0 to 8.5 range (preferably 6.5 to 8.5).

Temperature, oxygen, pH, and presence or absence of ephippia should be monitored in each culture vessel, preferably daily; weekly or more frequent monitoring is recommended for water hardness, and for total residual chlorine if municipal water is used.

*Section 3*

# Facilities

Tests must be performed in a separate laboratory, a portion walled or curtained off for control of lighting, or in an environmental chamber. This facility must be isolated from physical disturbance; dust and fumes should be minimized.

Test vessels must be large enough that the loading density does not exceed one daphnid per 15 millilitres of solution. Borosilicate glass beakers (150- or 250-mL) or glass screw-top test tubes are good; bags made of inert nontoxic plastic (e.g., polyethylene or polypropylene; Whirl-Pak™) may also be used but must not be re-used. It is recommended that the test vessels be covered, and if volatile components are suspected in the effluent, the vessels must be closed and there should be little air space. The vessels and all other material and equipment that may contact the test solutions or control/dilution water must not contain leachable substances, nor should they sorb toxicants from the test solution. All containers and apparatus must be thoroughly cleaned and rinsed with control/dilution water or deionized water in accordance with good laboratory procedures.

*Section 4*

# General Procedures for Determining Acute Lethality of Effluent

## *4.1 Sample Labelling, Transport, and Storage*

Sample-volume requirements depend on numbers of daphnids exposed to each test solution, loading-density requirements, test concentrations, and the use of replicates. Sample volumes of 2L or more (depending on chemical-analytical requirements) are normally required for either single-concentration tests or determination of an $LC_{50}$.

Containers for storage and transportation of effluent samples must be of nontoxic material, for example: glass, polyethylene, or polypropylene. The containers must be new or thoroughly cleaned and dried, and should be rinsed with uncontaminated water, then with the sample to be collected. They should be filled with sample to exclude air and then be sealed. Labelling must include at least sample type, source, date and time of collection, and name of sampler(s).

Samples should be kept from freezing. During transport, samples should be kept dark, with a temperature from 1 to 8 °C (preferably 4 ± 2 °C) if more than two days are spent in transit. Upon arrival at the laboratory, samples may be adjusted immediately or overnight to 20 ± 2 °C, then testing commenced. If stored at the test facility, samples must be kept dark and cool (8 °C or less, preferably 4 ± 2 °C).

Testing of samples should commence as soon as possible after collection. The test should begin within three days and must commence no later than five days after termination of sampling. Samples must be agitated thoroughly just before pouring aliquots for preparing solutions. Sub-samples (a sample divided between two or more containers) must be combined.

## *4.2 Test Conditions*

This is a 48-h static test (i.e., with no replacement of solutions). Density of daphnids in solutions must not exceed one animal per 15 mL. Daphnids are not fed during the test. The test is not valid if mortality in the control exceeds 10% or if > 10% of control organisms show overt, stressed behaviour (e.g., immobility).

The test must be conducted at 20 ± 2 °C and with a solution hardness of ≥ 25 mg/L. During the test, solutions are not aerated nor is pH adjusted. Lighting must be the same as that defined for culturing in Section 2.3. Photoperiod (a light:dark cycle of 16 ± 1h : 8 ± 1 h) must coincide with the timing which prevailed during culturing.

The test must be conducted without adjustment of sample or solution pH. However, if it is desired to understand the extent to which extremes in solution or sample pH (e.g., outside the range 6.0 to 8.5) may contribute to acute lethality, a parallel (pH-adjusted) test may be used. If both pH-adjusted and non-adjusted tests are run, definitive results should be those derived from the non-adjusted test. Rationale and

procedural details regarding pH adjustment of effluent samples are provided in Environment Canada (1990a). Adjustment of pH is also one of a number of "Toxicity Identification Evaluation" (TIE) techniques for characterizing the cause of sample toxicity (Mount and Anderson-Carnahan, 1988).

## *4.3 Preparing Test Solutions*

Adjustment of the effluent sample and control/dilution water to 20 ± 2 °C must be done if temperature is outside that range.

If it is possible that the effluent sample may be very low in hardness, then that must be measured before preparing solutions. If the sample has a hardness < 25 mg/L, it must be adjusted to a hardness of 25 ± 5 mg/L by adding sodium bicarbonate ($NaHCO_3$), calcium sulphate ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$), magnesium sulphate ($MgSO_4$) and potassium chloride (KCl) in the ratio 1.6 : 1.265 : 1.0 : 0.0667 [see formula for reconstituted water, Table 2 in Environment Canada (1990a)]. For each desired incremental increase of 5 mg/L of hardness, add the following to each litre of effluent: 5.11 mg of $NaHCO_3$; 4.04 mg of $CaSO_4 \cdot 2H_2O$; 3.19 mg of $MgSO_4$; and 0.213 mg of KCl.

Control/dilution water is to be the same as that used for culturing (Section 2.2). If temperature of this water is adjusted upwards, supersaturation with gases must be avoided. It must have an oxygen content within the range 90 to 100% air saturation, achieved if necessary by vigorous aeration with oil-free compressed air passed through air stones or glass diffusers.

Test vessels should be rinsed with control/dilution water just before use. Test solutions are made up just before their use, in sufficient volumes for convenient sampling and initial chemical measurements. Solutions must be well mixed with a glass rod, Teflon™ stir bar, or other non-reactive device. All test beakers or test tubes, measurement devices, stirring equipment, and daphnid-transfer vessels must be thoroughly cleaned and rinsed in accordance with standard operational procedures.

Dissolved oxygen must be measured in at least the highest test concentration (normally 100% effluent) when it is prepared. If (and only if) oxygen in the highest test concentration is <40% or >100% of air saturation, then pre-aeration (i.e., prior to daphnid exposure) of all test solutions including the control(s) must be commenced at a rate ≤ 7.5 mL/min · $L^{-1}$ (Environment Canada, 1990a). This period of aeration must be restricted to the lesser of 120 minutes and attaining 40% saturation in the highest test concentration (or 100% saturation, if supersaturation is evident). Aeration of each test solution is then to be stopped, test organisms introduced, and the test initiated immediately, regardless of whether 40 to 100% saturation was achieved in all test solutions. Any pre-aeration of test solutions should be provided by bubbling compressed air through a clean silica-glass air diffuser or disposable glass pipette (Environment Canada, 1990a). Bubble size should range from 1 to 3 mm.

## *4.4 Beginning the Test*

Each test vessel must be clearly coded or labelled with concentration, date and time of start, and the concentrations should preferably be positioned at random.

Neonates are to be used for the test. Adult females bearing embryos in their brood

pouches are removed from the stock cultures, 24 h before the test. These females are transferred to clean glass beakers (400 mL to 1 L) containing control/dilution water and an inoculum of prepared food at the concentration used in culturing. Water must have been adjusted to 20 ± 2 °C and 90 to 100% air-saturation with dissolved oxygen before adding the adults; it should not be aerated. Stocking density in the beakers should be approximately 20 adults/L or less. Young found on the following day are used for the toxicity test.

It is desirable but not absolutely required to use females 2 to 4 weeks of age, to avoid both young and senescent females. Separate culture vessels may be stocked periodically with neonates, which at age 2 to 4 weeks will have become neonate-producing adults with offspring available for testing.

To begin the test, equal numbers of neonates are to be introduced into each solution and the control, at least ten per treatment, without exceeding the density of one individual per 15 mL. The order of adding daphnids to vessels should be randomized beforehand. Neonates should be handled as described in Section 2.1; floating and injured ones should be replaced immediately after transfer.

## *4.5 Observations and Measurements*

Colour, turbidity, odour, and floating or settling solids in the sample should be noted at the start of the test. The appearance of test solutions should also be noted, and any obvious changes during the test should be recorded.

Measurements of dissolved oxygen and pH must be made in each test concentration including the control(s), at the start of the test and at the end when biological observations are complete. The conductivity of each test solution should be measured at the start of the test as a minimum. Temperature should be measured daily in representative test solutions.

The hardness of control and 100% effluent solutions is measured at the start of the test. These initial measurements are made on larger volumes of solutions made up in beakers, after adjustments have been made and just before their use to fill the actual test vessels (Section 4.3).

General observations on narcotization, unusual movement, or other behaviour should be made when starting the exposure. At the end of the test (48h), numbers of dead daphnids in each vessel should be recorded. Death is defined here as the lack of all movement of the antennae, other appendages and heart, as observed through a dissecting microscope.

With some narcotic toxicants, daphnids may become completely immobile and the heart rate may slow to 1 or 2 beats/min. In such a case, beating of the heart becomes the final criterion of death. If such narcosis is suspected, but careful observation of the heart cannot be made, numbers of daphnids immobilized at 48 h should be recorded. Immobilization is defined here as the inability to swim during a 15-second time period following gentle agitation of the solution, even if the antennae are still moving.

Observations of daphnids are aided by a black background or by illumination from the side or below. Opaque solutions and corresponding control solutions may be poured into Petri™ plates for observation, but only at the end of the test (Environment Canada, 1990a). If necessary, solutions may be poured through netting at the end of the test, and the daphnids re-suspended in water for observation.

*Section 5*

# Procedure for Testing a Single Concentration of Effluent

conditions, procedures, and facilities specified in Sections 1, 2, 3, 4, 7 and 8 apply to this procedure.

This procedure uses one concentration of effluent, 100% unless otherwise specified, plus a control. It uses a minimum of six vessels to test three replicate effluent solutions and three replicate control solutions (i.e., triplicates of each), with at least ten daphnids per triplicate.

The end point for this test is percent mortality at 48 h, reported for each replicate of effluent and control ($n \geq 10$). If immobilization is the sole biological effect observed (Section 4.5), the test end point is percentage of immobilization at 48 h, reported for each replicate. Effect on 50% of the individuals is commonly used, and is associated with greater precision of measurement than percentages such as 20% or 80% which are closer to the extremes of the distribution of effects.

For the purpose of providing a single value representing percent mortality (and/or percent immobilization) for each of the effluent and control treatments, the mortality (and/or immobility) data for the three replicates are to be combined. The test is invalidated if > 10% of the control daphnids (combined data) exhibit overt stressed behaviour (e.g., immobility) and/or mortality, or if >2 of the control animals in any single test vessel exhibit either of these responses.

*Section 6*

# Procedure for Determining an $LC_{50}$ for Effluent

All conditions, procedures, and facilities specified in Sections 1, 2, 3, 4, 7 and 8 apply to this procedure.

At least five concentrations of effluent plus a control (dilution water only) must be used in tests to estimate an $LC_{50}$. The highest concentration must be full-strength effluent, and each successive concentration must have at least 50% of the strength of the next higher one. A geometric (logarithmic) series is beneficial (e.g., percentage concentrations such as: 100, 50, 25, 12.5, and 6.3). Concentrations may be based on other proportions or on standard dilution series (see Appendix D of Environment Canada, 1990a).

For these multi-concentration tests, calculate the 48-h $LC_{50}$ and its 95% confidence limits, and report them, along with the method of calculation. Computer programs for calculating $LC_{50}$ and confidence limits are available (Environment Canada, 1990a) and should be used. A recommended program is available for copying onto a user-supplied disk through courtesy of C.E. Stephan (Stephan, 1977), from Environment Canada (address in Appendix). A check of the computer-derived $LC_{50}$ should be made by examining a plot on logarithmic-probability scales, of percent mortalities at 48 h for the various concentrations (see Environment Canada, 1990a).

If death cannot be confirmed, a 48-h $EC_{50}$ for immobilization (Section 4.5) should be reported rather than an $LC_{50}$. The statistical procedure for estimating an $EC_{50}$ and its confidence limits is the same as for an $LC_{50}$ except for the different criterion of effect.

Replicates of each concentration may be used but are not required. If replicates are used, their data are combined for calculating the $LC_{50}$. The precision of the estimate of $LC_{50}$ increases with more organisms, but not necessarily its accuracy.

The test is invalidated if > 10% of the control daphnids (combined data if replicates are used) exhibit overt stressed behaviour (e.g., immobility) and/or mortality, or if > 2 of the control animals in any single test vessel exhibit either of these responses.

*Section 7*

# Procedure for Tests With a Reference Toxicant

A reference toxicant must be used to assess the relative sensitivity of daphnids and the precision of data produced by the laboratory. The selected reference toxicant(s) must be tested within 14 days of when an effluent is tested. The procedures and conditions to be followed are to be identical to those in Section 4 and as described in Environment Canada (1990a), except that a reference chemical is measured out and tested, instead of an effluent. The culture/control/dilution water used routinely in effluent tests (Section 2.2) must also be used for the reference toxicant.

One or more of sodium chloride (NaCl), potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$), or zinc sulphate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) are recommended for use as reference toxicants. The 48-h $LC_{50}$ should be determined for the reference toxicant(s) used and expressed as mg/L based on NaCl, chromium ($Cr^{+++}$), or zinc ($Zn^{++}$) (Environment Canada, 1990a). Stock solutions should be made up on the day of use or stored in the dark, potassium dichromate in glass-stoppered bottles, and zinc at pH 3 to 4.

Concentrations of reference toxicant in all stock solutions should be measured chemically by appropriate methods (APHA *et al.*, 1989). Upon preparation of the test solutions, aliquots are to be taken from the control, low, middle, and high concentrations (as a minimum), and analyzed directly or stored for future analysis should the $LC_{50}$ be atypical (outside warning limits). If stored, sample aliquots must be held in the dark at 4 ± 2 °C. Zinc solutions should be acidified before storage. Stored aliquots requiring chemical measurement should be analyzed promptly upon completion of the toxicity test.

It is desirable but not required, to measure concentrations in the same solutions at the end of the test after completing biological observations. Calculations of $LC_{50}$ should be based on measured concentrations if they are appreciably different (i.e., ≥ 20%) from nominal ones.

A warning chart (Environment Canada, 1990b) or similar record must be prepared for each reference toxicant used, and continually updated. Successive $LC_{50}$s are plotted to determine whether they are within ± 2 SD of the geometric mean (or arithmetic mean, in those instances where data are not normally distributed) of previous $LC_{50}$s. The geometric mean with its upper and lower warning limits (± 2 SD, still calculated on a logarithmic basis) is recalculated with each successive $LC_{50}$ until the statistics stabilize (U.S. EPA, 1985a; Environment Canada, 1990b). If a particular $LC_{50}$ falls outside the warning limits, sensitivity of the organisms and validity of recent effluent tests are both suspect. A check of all culturing conditions is required under these circumstances. Depending on the findings, further acclimation and re-evaluation (with one or more reference toxicants) of the culture should be undertaken, or a new culture of daphnids established and tested for its suitability in toxicity tests (see Section 2.1).

*Section 8*

# Reporting Requirements

The following is a summary of reporting and record-keeping requirements associated with this reference method. Further details or explanation can be found within previous sections of this method.

Unless otherwise specified by Environment Canada, all items listed in Section 8.1 must be reported to Environment Canada for each completed toxicity test. The information is to be provided in accordance with pertinent regulations, and in a manner and format specified by Environment Canada* (i.e., manual or electronic; transmission mode; form and content).

Information additional to that in Section 8.1, such as that required by or distinctive to a regulation, or that which is necessary to clarify reporting and data assessment, may also be specified by Environment Canada.

Unless otherwise specified by Environment Canada, those items listed under Section 8.2 must be recorded and held on file for a period of five years. This information is to be provided as and when requested by Environment Canada. It will be required on a less frequent basis such as during an audit or investigation.

## *8.1 Data to be Reported*

### *8.1.1 Effluent*

- name and location of operation generating the effluent;
- date and time of sampling;
- type of sample (e.g., "whole effluent from plant", "final mill effluent", "discharge from emergency spill lagoon", "leachate");
- brief description of sampling point;
- sampling method (e.g., "grab", "batch", "24-h composite with sub-samples at 1-h intervals");
- person collecting sample; and
- indication if sample was frozen or partially frozen in transit.

### *8.1.2 Test Facilities and Conditions*

- test type and protocol (e.g., "single-concentration test", protocol specified in Reference Method EPS 1/RM/14;

* Contact an office listed in the Appendix for details.

- indication of any differences from method given in this document;
- name and city of testing laboratory;
- species of test organism;
- date and time for start of definitive test;
- persons performing the test and verifying the results;
- the pH, temperature, dissolved oxygen and conductivity of unadjusted, undiluted effluent, just before preparing test solutions;
- indication of any adjustment of hardness of effluent sample and, if adjusted, measurements of sample hardness before and after adjustment;
- indication of any aeration of test solutions (rate, time) before introduction of daphnids;
- concentrations and volumes tested, including controls, and indication of replication;
- measurements of dissolved oxygen, pH, temperature, and conductivity determined for each test solution (including control(s)) during the test; hardness measurements on 100% effluent and control solutions;
- most recent estimates of time to first brood and average number of neonates per brood; and
- number of neonates per test vessel and millilitres of solution per daphnid.

#### *8.1.3 Results*

- number of dead and/or immobile daphnids in each test solution (including control(s)) at 48 h;
- for single-concentration test, number of daphnids dead (or immobilized if death cannot be confirmed) in each of three replicate effluent solutions and in each of three replicate control solutions ($n \geq 10$) at end of test; mean value representing percent dead (or percent immobilized) for each of the effluent and control solutions;
- estimate of 48-h $LC_{50}$ and 95% confidence limits in multi-concentration tests, by computer calculation; the 48-h $EC_{50}$ for immobilization and 95% confidence limits, if determined; indication of statistical method (e.g., log probit, moving average) on which result is based; and,
- most recent 48-h $LC_{50}$ (with 95% confidence limits) for reference toxicant(s); chemical(s); date test initiated; historic geometric mean $LC_{50}$; and warning limits ($\pm 2$ SD).

### *8.2 Data to be Held on File**

#### *8.2.1 Effluent*

- detailed description of sampling point, source and type of effluent;
- type of container(s) and label or code used;

---

* To be stored for a five-year period at the test facility and/or the offices of the discharger. Some of this

- volume and/or weight of sample;
- transport and storage conditions (times, temperatures);
- appearance and other properties (observations on colour, turbidity, odour, floating or settleable material);
- colour change, precipitation, flocculation, release of volatiles or other changes when making up test solution(s); and
- procedures and results for any chemical analyses (e.g., suspended solids content, hardness).

*8.2.2 Test Facilities and Conditions*

- address of testing laboratory;
- description of culturing and test facilities including general layout of each and means of isolation;
- source of test species and date obtained;
- usual culturing conditions (containers, location, lighting, temperatures, aeration, frequency of water replacement, maximum density, food type, ration and frequency of feeding);
- brief history of test-specific conditions and procedures for culturing and handling daphnids if different from usual practice;
- source of culture/control/dilution water; usual pre-treatment, if any (e.g., procedures for adjustment of temperature, aeration, dechlorination); procedures for preparing and storing reconstituted water, if used; types and concentrations of any nutrients (e.g., selenium, Vitamin $B_{12}$) added;
- quality (mean and range values) of culture/control/dilution water; to include hardness, pH, conductivity, dissolved oxygen content, and total residual chlorine (if municipal water); preferably also total dissolved gases, alkalinity, solids, organic carbon, colour, mineral ions, metals, ammonia, nitrite, and organophosphorus pesticides;
- systems to regulate light and temperature;
- light source, photoperiod, and past measures of intensity at surface of culture and test vessels;
- description of test vessels (size, shape, and material), covers, and routine cleaning and rinsing procedures for each;
- method of obtaining neonates for tests;
- percentage mortality in culture during seven days preceding the test;
- appearance of solutions; any changes during test;
- test concentrations of reference toxicant(s), both nominal and measured; indication of data set used to estimate $LC_{50}$; and
- any measurements of water quality in test solutions not included in data reported (Section 8.1.2).

*8.2.3 Results*

- any observations of numbers of daphnid-mortalities (or numbers immobilized if death cannot be confirmed) not included in data reported (e.g., at 24 h);
- observations of daphnid behaviour and appearance noted and recorded for each

test solution during or upon completion of the test;

- confirmation that graph verified the computer-derived $LC_{50}$(s); and
- reason if number immobilized is substituted for number dead.

# References


APHA *et al.*, "Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms", p. 8-1 – 8-143, in: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th ed. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation, Washington, D.C., Part 8000, (1989).

ASTM, "Standard Practice for Conducting Static Acute Toxicity Tests on Wastewaters with *Daphnia*", p. 27-39, in: *Annual Book of ASTM Standards*, Amer. Soc. for Testing and Materials, Philadelphia, PA, Vol. 11.01, Designation D 4229 (1984).

B.C. MOE, "Daphnia 48 hr Acute Mortality Bioassay Procedure", B.C. Ministry of Environment and Parks, Environmental Laboratory, Draft document, Vancouver, B.C. (1988).

BHSC " Testing for Acute Toxicity to *Daphnia*", p. 14-18, in: *Methods for the Determination of Ecotoxicity*, British Health and Safety Commission, London, U.K. (1982).

BNQ, "Eaux - Détermination de la toxicité. Méthode avec le microcrustacé *Daphnia magna*", ministère de l'Industrie et du Commerce, Bureau de Normalisation du Québec, Québec (1990).

Environment Canada," Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp.", Conservation and Protection, Ottawa, Ontario, Report EPS 1/RM/11 (1990a).

Environment Canada, "Guidance Document for Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants", Conservation & Protection, Ottawa, Ontario, Report EPS 1/RM/12 (1990b).

EPS, "Standard Procedure for Testing the Acute Lethality of Liquid Effluents", Environ. Prot. Serv., Environment Canada, Regulations, Codes and Protocols, Ottawa, Ontario, Report EPS 1-WP-80-1, (1980).

Greene, J.C., C.L. Bartels, W.J. Warren-Hicks, B.P. Parkhurst, G.L. Linder, S.A. Peterson, and W.E. Miller, "Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites", U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR (1988).

IGATG, "Acute Lethality/Immobility Testing Protocols and Procedures for the Water Flea, *Daphnia magna*. Addendum 2, Part C", to: Sergy, G. 1987. Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environmental Protection, Environment Canada, Edmonton, Alberta (1986).

ISO, "Water Quality -- Determination of the Inhibition of Mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)", First edition, International Organization for Standardization, Report No. ISO 6341-1982 (E), Geneva, Switzerland (1982).

Mount, D.I. and L. Anderson-Carnahan, "Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase I. Toxicity Characterization Procedures", U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, Report EPA-600/3-88/034 (1988).

OECD, "*Daphnia* sp., 14-day Reproduction Test (including an acute immobilization test)", Organization for Economic Cooperation and Development, Document No. 202, Paris, France (1981).

Plotkin, S. and N.M. Ram, "Acute Toxicity Tests: General Description and Materials and Methods Manual, II. *Daphnia*", Univ. of Massachusetts, Dept of Civil Engineering, Report No. Env.E.73-83-4, Amherst, MA (1983).

Poirier, D.G., G.F. Westlake, and S.G. Abernethy, "*Daphnia magna* Acute Lethality Toxicity Test Protocol", Aquatic Toxicity Unit, Water Resources Branch, Ontario Ministry of Environment, Rexdale, Ontario (1988).

Stephan, C.E., "Methods for Calculating an $LC_{50}$", p. 65-84, in: *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, F.L. Mayer and J.L. Hamelink (eds.), Amer. Soc. for Testing and Materials, Philadelphia, PA, ASTM STP 634, (1977).

The Netherlands, " Determination of Toxicity", Chapter 5 in: *Degradability Ecotoxicity and Bio-accumulation. The Determination of the Possible Effects of Chemicals and Wastes on the Aquatic Environment*, Govt. Publishing Office, The Hague, The Netherlands (1980).

U.S. EPA, "Daphnid Acute Toxicity Test", U.S. Environmental Protection Agency, Office of Toxic Substances, Document EG-1/ES-1, Washington, D.C. (1982).

U.S. EPA, "Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms", W.H. Peltier and C.I. Weber (eds.), U.S. Environmental Protection Agency, Report EPA/600/4-85/013, Cincinnati, OH (1985a).

U.S. EPA, "Acute Toxicity Test for Freshwater Invertebrates", U.S. Environmental Protection Agency, Hazard Evaluation Division, Office of Pesticides Programs, Washington, D.C., Report EPA-540/9-85-005 (1985b).

*Appendix*

# List of Members of the Inter-Governmental Aquatic Toxicity Group and Conservation & Protection Regional and Headquarters' Office Addresses

## Members of the Inter-Governmental Aquatic Toxicity Group*

***Federal*****

P. Wells (Chairperson)
EP, Dartmouth, Nova Scotia

B. Moores
St. John's, Newfoundland

K. Doe
Dartmouth, Nova Scotia

W. Parker
Dartmouth, Nova Scotia

N. Bermingham
Longueuil, Québec

C. Blaise
Longueuil, Québec

G. Elliott
Edmonton, Alberta

R. Watts
North Vancouver, British Columbia

K. Day
National Water Research Institute
Burlington, Ontario

B. Dutka
National Water Research Institute
Burlington, Ontario

C. Kriz
Federal Programs Branch
Ottawa, Ontario

D. MacGregor
Commercial Chemicals Branch
Ottawa, Ontario

P. MacQuarrie
Commercial Chemicals Branch
Ottawa, Ontario

R. Scroggins
Industrial Programs Branch
Ottawa, Ontario

G. Sergy
Technology Development Branch
Edmonton, Alberta

P. Farrington
Water Quality Branch
Ottawa, Ontario

***Provincial***

C. Bastien
Ministère de l'Environnement du Québec
Sainte Foy, Québec

G. Westlake
Ontario Ministry of Environment
Rexdale, Ontario

W. Young
Manitoba Environment and Public Safety
Winnipeg, Manitoba

K. Lauten
Saskatchewan Environment and Public Safety
Regina, Saskatchewan

J. Somers
Alberta Environment
Vegreville, Alberta

S. Horvath
B.C. Ministry of Environment
Vancouver, British Columbia

G. van Aggelen
B.C. Ministry of Environment
North Vancouver, British Columbia

---

* IGATG membership as of July 1990
** Conservation and Protection, Environment Canada

# Conservation & Protection Regional and Headquarters' Office Addresses

**Headquarters**
351 St. Joseph Boulevard
Place Vincent Massey
Hull, Québec
K1A 0H3

**Atlantic Region**
15th Floor, Queen Square
45 Alderney Drive
Dartmouth, Nova Scotia
B2Y 2N6

**Québec Region**
1141 Route de L'Eglise
P.O. Box 10100
Sainte Foy, Québec
G1V 4H5

**Ontario Region**
25 St. Clair Ave. East, 6th Floor
Toronto, Ontario
M4T 1M2

**Western and Northern Region**
Room 210, Twin Atria # 2
4999 -98 Avenue
Edmonton, Alberta
T6B 2X3

**Pacific and Yukon Region***
224 West Esplanade Street
North Vancouver, British Columbia
V7M 3H7

---

* A BASIC computer program for calculating $LC_{50}$s is available for copying onto a formatted 13-cm IBM-compatible floppy disk supplied by the user, by contacting the Aquatic Toxicity Laboratory at this address.

# Série de la Protection de l'environnement

## Méthode d'essai biologique :

## méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez *Daphnia magna*

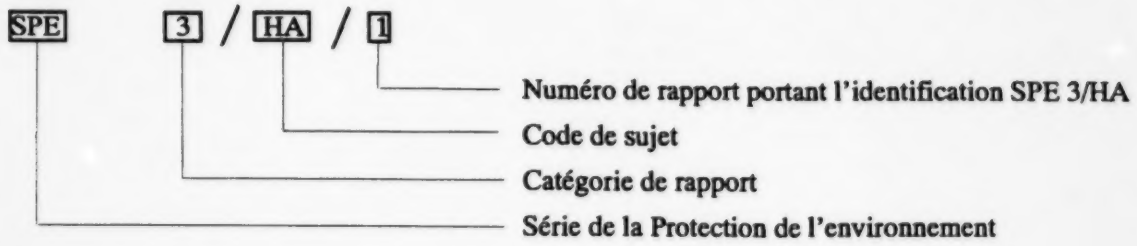
Méthode de référence SPE 1/RM/14
Juillet 1990

Canada

Environnement Canada Environment Canada

**SÉRIE DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT**

**Exemple de numérotation :**


SPE
3 / HA / 1
Numéro de rapport portant l'identification SPE 3/HA
Code de sujet
Catégorie de rapport
Série de la Protection de l'environnement

**Catégories**

1 Règlements/Lignes directrices/ Codes de pratiques
2 Évaluation des problèmes et options de contrôle
3 Recherche et développement technologique
4 Revues de la documentation
5 Inventaires, examens et enquêtes
6 Évaluations des impacts sociaux, économiques et environnementaux
7 Surveillance
8 Propositions, analyses et énoncés de principes généraux
9 Guides

**Sujets**

AG Agriculture
AN Technologie anaérobie
AP Polluants atmosphériques
AT Toxicité aquatique
CC Produits chimiques commerciaux
CE Consommateurs et environnement
CI Industries chimiques
FA Activités fédérales
FP Traitement des aliments
HA Déchets dangereux
IC Chimie inorganique
MA Pollution marine
MM Exploitation minière et traitement des minéraux
NR Régions du Nord et rurales
PF Papier et fibres
PG Production d'électricité
PN Pétrole et gaz naturel
RA Réfrigération et climatisation
RM Méthodes de référence
SF Traitements de surface
SP Déversements de pétrole et de produits chimiques
SRM Méthodes de référence normalisées
TS Systèmes de transport
TX Textiles
UP Pollution urbaine
WP Protection/préservation du bois

Des sujets et des codes additionnels sont introduits au besoin. On peut obtenir une liste des publications de la SPE en s'adressant aux Publications de la Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0H3.

*Cette publication est imprimée sur du papier contenant des rebuts recyclés.*

# Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez *Daphnia magna*

Protection de l'environnement
Conservation et Protection
Environnement Canada

Méthode de référence SPE 1/RM/14
Juillet 1990

**Données de catalogage avant publication (Canada)**

Vedette principale au titre:

Méthode d'essai biologique. Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez Daphnia magna

(Méthode de référence ; SPE 1/RM/14)
Texte en français et en anglais disposé tête-bêche.
Titre de la p. de t. addit.: Biological test method, reference method for determining acute lethality of effluents to Daphnia magna.
Comprend des références bibliographiques.
ISBN 0-662-57747-7
N° de cat. MAS En49-24/1-14

1. Daphnies -- Mortalité -- Essais -- Normes -- Canada. Daphnies -- Microbiologie -- Normes -- Canada. 3. Effluents -- Qualité -- Essais -- Normes -- Canada. I. Canada. Direction générale de la protection de l'environnement. II. Canada. Environnement Canada. III. Coll.: Rapport (Canada. Environnement Canada); SPE 1/RM/14. IV. Titre: Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez Daphnia magna.

QL444.B83 1990 595.3'2 C90-098699-9F

©Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1990
No de catalogue En 49-24/1-14
ISBN 0-662-57747-7
IMPRIMERIE BEAUREGARD LIMITÉE

# Commentaires

Pour formuler des commentaires ou obtenir des renseignements sur l'utilisation de la présente méthode de référence, s'adresser à :

M. Gary Sergy
Direction du développement technologique
Environnement Canada
4999, 98$^{e}$ avenue, pièce 210
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

M. Richard Scroggins
Direction des programmes industriels
Environnement Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

Dans le présent document, la mention d'appellations commerciales ne constitue nullement une recommandation de la part d'Environnement Canada; d'autres produits de valeur semblable peuvent être utilisés.

# Résumé

*Le présent document décrit en termes explicites une méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez le crustacé* Daphnia magna *(«puce d'eau»). Il donne des instructions précises pour l'exécution d'essais de létalité aiguë portant sur des échantillons d'effluents et pour la présentation des résultats de ces essais; il complète ainsi les directives générales fournies dans le document de méthodologie intitulé* Méthode d'essai biologique : essai de toxicité aiguë sur *Daphnia* spp. *(Environnement Canada, 1990a).*

*Trois méthodes sont exposées : 1) pour un essai à concentration unique portant sur l'effluent non dilué, sauf indication contraire; 2) pour un essai à concentrations multiples visant à déterminer la concentration létale 50 ($CL_{50}$) de l'effluent; 3) pour un essai portant sur un produit toxique de référence. Des instructions sont fournies concernant la détention et l'élevage des daphnies, les installations et l'approvisionnement en eau, la manipulation et le stockage des échantillons, la préparation des solutions, les conditions de l'essai, les observations à faire, les résultats de l'essai et les méthodes de calcul connexes ainsi que l'utilisation de produits toxiques de référence.*

# Table des matières

**Résumé** ..... v
**Glossaire** ..... ix
**Remerciements** ..... xii

*Section 1*
**Introduction** ..... 1

*Section 2*
**Élevage des organismes** ..... 3
**2.1** Procédés d'élevage ..... 3
**2.2** Eau ..... 4
**2.3** Conditions physico-chimiques ..... 4

*Section 3*
**Installations** ..... 6

*Section 4*
**Mode opératoire général pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents** ..... 7
**4.1** Étiquetage, transport et stockage des échantillons ..... 7
**4.2** Conditions de l'essai ..... 7
**4.3** Préparation des solutions d'essai ..... 8
**4.4** Mise en route de l'essai ..... 9
**4.5** Observations et mesures ..... 9

*Section 5*
**Mode opératoire pour l'essai d'une concentration unique d'effluent** ..... 11

*Section 6*
**Mode opératoire pour la détermination de la $CL_{50}$ d'un effluent** ..... 12

*Section 7*
**Mode opératoire pour l'essai d'un produit toxique de référence** ..... 13

*Section 8*
**Présentation des résultats** ..... **15**
**8.1** Données à consigner au procès-verbal ..... **15**
**8.1.1** Effluent ..... **15**
**8.1.2** Installations et conditions de l'essai ..... **15**
**8.1.3** Résultats ..... **16**
**8.2** Données à verser au dossier ..... **17**
**8.2.1** Effluent ..... **17**
**8.2.2** Installations et conditions de l'essai ..... **17**
**8.2.3** Résultats ..... **18**

**Références** ..... **19**

*Annexe*
**Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique et adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux de Conservation et Protection** ... **21**

# Glossaire

Toutes les définitions ci-après s'appliquent aux méthodes énoncées dans le présent rapport; les autres définitions figurant dans le document d'accompagnement détaillé (Environnement Canada, 1990a) s'y appliquent aussi.

Aigu - Survenant dans un bref délai, normalement 48 h ou moins dans le cas des daphnies.

$CE_{50}$ - Concentration efficace 50, soit la concentration dans l'eau d'une substance qui est censée causer un effet particulier, létal ou non létal, pour 50 % des organismes soumis à l'essai. L'effet particulier doit être précisé, ainsi que la durée d'exposition (p. ex., $CE_{50}$ d'inhibition de la mobilité à 48 h).

$CL_{50}$ - Concentration létale 50, soit la concentration dans l'eau d'une substance (dans le cas qui nous occupe, un effluent) qui est censée être létale pour 50 % des organismes soumis à l'essai après une durée d'exposition définie (p. ex., 48 h).

Conductivité - Expression numérique de la capacité d'une solution aqueuse de transporter un courant électrique. Cette capacité dépend des concentrations des ions en solution, de leur valence et de leur mobilité, ainsi que de la température de la solution. La conductivité s'exprime normalement en millisiemens par mètre (unité SI), ou en µmho/cm (1 mS/m = 10 µmho/cm).

Contrôle - Traitement reproduisant l'ensemble des facteurs qui pourraient influencer les résultats d'une enquête ou d'une étude, à l'exception de la condition particulière faisant l'objet de cette étude. Dans un essai de toxicité, le contrôle doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, sans porter sur la substance à expérimenter. Le contrôle est utilisé pour établir l'absence de toxicité en raison de conditions de base de l'essai, telles que la qualité de l'eau de dilution et l'état de santé ou la manipulation des organismes soumis à l'essai.

Dureté - Somme des concentrations de calcium et de magnésium dans l'eau, exprimée en mg/L de carbonate de calcium.

Eau de contrôle/de dilution - Eau utilisée pour le contrôle, pour diluer la substance à expérimenter ou à l'une et l'autre de ces fins.

Eau de dilution - Eau utilisée pour diluer la substance à expérimenter afin d'en préparer différentes concentrations pour l'essai de toxicité.

Eau désionisée - Eau à laquelle on a fait traverser des colonnes de résine afin d'en extraire les ions et de la purifier.

Eau reconstituée - Eau désionisée ou distillée au verre à laquelle des produits chimiques réactifs ont été ajoutés. L'eau douce synthétique qui en résulte est exempte de contaminants et possède le pH et la dureté souhaités.

Effluent - Tout déchet liquide (industriel ou urbain) rejeté dans l'environnement aquatique.

Élevage - Ensemble des animaux qu'on élève dans des conditions contrôlées afin d'obtenir, par reproduction, des organismes devant être soumis à des essais.

Éphippium - Sac ovigère qui se forme sous la partie postéro-dorsale de la carapace de la daphnie femelle adulte, dans des conditions d'élevage difficiles. Les oeufs qui s'y trouvent ont généralement été fertilisés par reproduction sexuelle.

Immobilité - Inaptitude à la nage pendant les 15 secondes suivant une légère agitation de la solution d'essai, même si les daphnies peuvent encore bouger leurs antennes.

Létal - Entraînant la mort par action directe. Dans le cas de la daphnie, on entend par «mort» la cessation de tous les signes visibles du mouvement ou d'activité, notamment en ce qui concerne les antennes, les pattes abdominales et le battement cardiaque observés au microscope.

Lux - Unité SI d'éclairement, mesurant l'intensité lumineuse par mètre carré. 1 lux = 0,0929 pied-bougie; 1 pied-bougie = 10,76 lux.

Néonate - Daphnie «née» depuis peu, c.-à-d. au premier stade larvaire, âgée de 24 h ou moins.

pH - Logarithme négatif de l'activité des ions d'hydrogène, mesurée par leur concentration en moles par litre. Cette valeur exprime le degré ou l'intensité des réactions acides et alcalines selon une échelle de 0 à 14, où le nombre 7 représente la neutralité et les nombres inférieurs correspondent, en ordre décroissant, à des réactions acides de plus en plus fortes. Les chiffres supérieurs à 7 indiquent, en ordre croissant, des réactions basiques ou alcalines de plus en plus fortes.

Photopériode - Durée d'éclairement et d'obscurité au cours d'un cycle de 24 h.

Prétraitement - Dans le présent rapport, traitement d'un échantillon ou de sa dilution avant l'exposition des daphnies.

Produit toxique de référence - Produit chimique étalon utilisé pour évaluer la sensibilité des organismes soumis à l'essai et la validité des mesures de la toxicité des effluents.

Salinité - Quantité totale, en grammes, de solides dissous dans 1 kg d'eau de mer. Elle se détermine après conversion de tous les carbonates en oxydes, après remplacement de tous les bromures et iodures par des chlorures et après oxydation de toutes les matières organiques. La salinité peut aussi se mesurer directement grâce à un salinimètre/conductimètre ou par d'autres moyens (APHA *et al.*, 1989). Elle s'exprime habituellement en parties par millier (‰).

Sublétal - Nocif pour les organismes, mais en deçà du niveau qui entraîne directement la mort pendant la durée de l'essai.

Toxicité - Capacité propre d'une substance de provoquer des effets nocifs chez les organismes vivants.

# Remerciements

La présente méthode de référence a été établie en fonction des objectifs, des besoins et des commentaires d'un sous-comité de la Protection de l'environnement (PE) formé de : N. Bermingham (PE, Montréal), C. Blaise (PE, Longueuil), G. Coulombe (PE, Montréal), K. Doe (PE, Dartmouth), G. Elliott (PE, Edmonton), D. MacGregor (PE, Ottawa), J. MacLatchy (PE, Ottawa), W. Parker (PE, Dartmouth), D. Robinson (Pêches et Océans Canada, Ottawa), T. Ruthman (PE, Ottawa), R. Scroggins (PE, Ottawa), G. Sergy (PE, Edmonton) et R. Watts (PE, North Vancouver). Pour leur contribution et leurs commentaires fort utiles, les représentants des provinces au sein du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (GITA) ont particulièrement droit à notre reconnaissance (G. Joubert, ministère de l'Environnement du Québec; G. Westlake, ministère de l'Environnement de l'Ontario; W. Young, ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique du Manitoba; K. Lauten, ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique de la Saskatchewan; J. Somers, ministère de l'Environnement de l'Alberta; S. Horvath et G. van Aggelen, ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique). Nous remercions sincèrement de leurs observations les examinateurs externes suivants : D. Vaughan (PE, Dartmouth), S. Wade (PE, Dartmouth), A. Beckett (PE, Edmonton), S. Yee (PE, North Vancouver), D. Moul (PE, North Vancouver), V. Zitko (Pêches et Océans Canada, St. Andrews), V. Cairns (Pêches et Océans Canada, Burlington), S. Samis, (Pêches et Océans Canada, Vancouver), D. Poirier (ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale), J. Moores (ministère de l'Environnement de l'Alberta, Vegreville), P. Martel (Institut canadien de recherches sur les pâtes et papiers, Pointe-Claire), Y. Bois (Technitrol·Eco Inc., Pointe-Claire), C.R. Cook (Produits forestiers E.B. Eddy Ltée, Espanola), G. Craig (Beak Consultants Ltd., Brampton), et D. Bradley, D. Monteith et J. Pickard (B.C. Research Corp., Vancouver). Nous tenons également à remercier l'équipe des laboratoires d'essai d'Environnement Canada (adresses à l'annexe).

MM. G. Sergy et R. Scroggins (PE, Environnement Canada) ont fait fonction de responsables scientifiques officiels et ont fourni leur collaboration et leurs conseils techniques. Le document a été rédigé en collaboration par MM. Don McLeay (McLeay Associates Ltd., West Vancouver, C.-B.) et John Sprague (J.B. Sprague Associates Ltd., Guelph, Ontario).

*Section 1*

# Introduction

Le présent document décrit les modes opératoires à employer pour les essais de létalité aiguë sur *Daphnia magna* qui sont exigés par le gouvernement du Canada dans les règlements sur la lutte contre la pollution applicables à diverses catégories d'industries. Ces modes opératoires ont pour origine des méthodes d'essai portant sur des poissons publiées antérieurement par Environnement Canada (p. ex., SPE, 1980). La présente méthode de référence devrait être utilisée conjointement avec un rapport plus complet qui présente des explications et des détails additionnels (Environnement Canada, 1990a).

Par bien des aspects, les modes opératoires exposés ci-après sont semblables à des méthodes établies par les provinces canadiennes (Colombie-Britannique, 1998; Poirier *et al.*, 1988; BNQ, 1990) ou employées aux États-Unis (EPA, 1982, 1985a et 1985b; Plotkin et Ram, 1983; ASTM, 1983; APHA *et al.*, 1989; Greene *et al.*, 1988) et dans d'autres pays (Pays-Bas, 1980; BHSC, 1982; OCDE, 1981; ISO, 1982; GITA, 1986). Ces méthodes se sont révélées fort utiles à la rédaction de l'ensemble du présent document, et elles constituent des sources de renseignements complémentaires très valables. Toutefois, aux fins de la réglementation, ce sont les modes opératoires présentés ci-après qu'on devrait appliquer.

L'organisme soumis à l'essai est la «puce d'eau» *Daphnia magna*, petit crustacé d'eau douce de l'ordre des cladocères. Cette daphnie se retrouve dans les étangs et les lacs de l'Amérique du Nord, y compris l'Ouest canadien, et elle est souvent un élément important des communautés aquatiques. Les daphnies sont sensibles à une vaste gamme de contaminants aquatiques, et elles sont utilisées dans de nombreux pays pour des essais de toxicité. À cet égard, elles présentent les avantages d'une petite taille et d'un cycle biologique court, qui permet des essais rapides; elles sont en outre relativement faciles à élever en laboratoire.

Trois modes opératoires de base sont décrits ci-après. Le premier porte sur une concentration unique d'effluent (l'échantillon non dilué, sauf indication contraire) et sur un contrôle, et il conviendrait à des essais comportant une cote de réussite ou d'échec. Le deuxième permet d'établir la concentration létale 50 ($CL_{50}$) ou, au besoin, la concentration efficace 50 ($CE_{50}$) d'inhibition de la mobilité, c'est-à-dire de déterminer le degré de toxicité de l'effluent au moyen de diverses concentrations, dont l'échantillon non dilué. Le troisième s'applique à un essai à concentrations multiples portant sur un produit toxique de référence, qui permet d'évaluer la sensibilité des organismes soumis à l'essai à un produit toxique étalon ainsi que la précision des données produites par le laboratoire.

Les essais doivent porter sur des effluents contenant de l'eau douce ou ayant une salinité inférieure ou égale à 10 ‰, définie par une conductivité inférieure ou égale à 1 550 mS/m à une température de 20 °C.

Les effluents de salinité supérieure à 10 ‰ qui sont rejetés dans des eaux douces devraient aussi faire l'objet d'essais fondés sur la présente méthode de référence et portant sur des daphnies élevées en eau douce; pour ceux qui sont rejetés directement en mer, on devrait utiliser une espèce autorisée par le laboratoire régional d'Environnement Canada (adresses à l'annexe) et acclimatée à une eau de mer de salinité semblable à celle de l'échantillon.

*Section 2*

# Élevage des organismes

Des néonates de *Daphnia magna* doivent être utilisées pour les essais.

On trouvera ci-après des exigences particulières pour l'élevage des daphnies; de plus amples explications sont fournies dans le document détaillé (Environnement Canada, 1990a). Il existe divers procédés d'élevage (EPA, 1982, 1985a; ASTM, 1984; Greene *et al.*, 1988; Poirier *et al.*, 1988); on peut juger de la réussite de chacun au moyen des critères énoncés à la fin de la section 2.1.

## *2.1 Procédés d'élevage*

Il est recommandé d'utiliser comme récipients d'essai des aquariums, des bocaux à large ouverture ou des béchers de verre. Il faut couvrir ces récipients pour les mettre à l'abri de la poussière et réduire l'évaporation. Les récipients et tous les accessoires entrant en contact avec les organismes, l'eau ou les milieux d'élevage doivent être fabriqués de matériaux non toxiques (p. ex., verre, acier inoxydable, Nalgene$^{MC}$, porcelaine, polyéthylène).

L'eau des réservoirs d'élevage devrait être presque entièrement remplacée au moins une fois par semaine. On devrait alors réduire la densité de la population de daphnies adultes à 20 animaux ou moins par litre.

On peut manipuler les daphnies adultes en versant doucement du liquide d'un contenant à un autre ou encore en les pipettant ou en les siphonnant avec soin. Les daphnies néonates sont vulnérables à l'emprisonnement d'air sous leur carapace, et on devrait les manipuler le moins possible, au moyen d'une pipette de verre jetable, coupée et polie à la flamme pour assurer une ouverture de 5 mm, dont l'extrémité devrait rester sous l'eau quand on libère les daphnies. Il faudrait procéder rapidement au transfert des organismes, en transportant le moins d'eau possible dans le nouveau contenant.

On doit utiliser au moins une espèce d'algue verte pour nourrir les daphnies, et il est fortement recommandé d'utiliser un mélange d'au moins deux espèces. De plus, on peut se servir d'un supplément tel que de la moulée de levure, de Cerophyll$^{MC}$ et de truite (Environnement Canada, 1990a, annexe C). Pour le mélange d'algues, il est avantageux de combiner une ou plusieurs espèces d'algues avec une espèce de diatomée; les algues doivent être cultivées dans un milieu de culture adéquat (Environnement Canada, 1990a).

La réussite des élevages de daphnies peut être évaluée au moyen des critères de santé suivants, qui doivent être respectés pour que les élevages puissent être utilisés dans des essais de toxicité. Le premier point devrait être vérifié constamment et les deux autres fréquemment :

- Il ne doit pas y avoir d'éphippiums dans l'élevage.
- Les femelles doivent avoir au plus 12 jours au moment de la naissance de la première couvée.

- Les femelles de deux à cinq semaines doivent produire une moyenne de *15 néonates ou plus par couvée.*

- Il ne devrait pas mourir plus de 25 % du stock de génitrices au cours des sept jours précédant l'essai, s'il s'agit d'un élevage regroupant plusieurs groupes d'âge.

Les conclusions d'un essai portant sur un produit toxique de référence (section 7) permettent aussi d'établir si un élevage convient à des essais de toxicité.

## *2.2 Eau*

L'eau devant servir pour l'élevage des daphnies et comme eau de contrôle/de dilution peut être de l'eau naturelle ou de l'eau reconstituée.

Dans le premier cas, on peut utiliser de l'eau souterraine ou de surface non contaminée ou de l'eau municipale déchlorée, pourvu que sa dureté se situe entre 80 et 250 mg/L. Dans le deuxième cas, on doit utiliser de l'eau modérément dure (c.-à-d. d'une dureté de 80 à 100 mg/L).

S'il faut utiliser de l'eau municipale déchlorée pour l'élevage ou comme eau de contrôle/de dilution, elle doit être exempte de toute concentration nocive de chlore au moment de l'exposition des daphnies. L'objectif établi pour la concentration en chlore résiduel total dans les élevages et dans l'eau de contrôle/de dilution des récipients d'essai est d'au plus 0,002 mg/L (Environnement Canada, 1990a).

Si l'on doit utiliser de l'eau reconstituée modérément dure (de 80 à 100 mg/L), on peut la préparer au moyen de toute formule éprouvée permettant d'obtenir des élevages de daphnies qui répondent aux critères de santé énoncés précédemment (Environnement Canada, 1990a). Le pH de cette eau doit être compris entre 7,0 et 8,0; des valeurs variant entre 7,4 et 7,8 sont fréquentes (Environnement Canada, 1990a). Il est nécessaire d'ajouter du sélénium et de la vitamine $B_{12}$ à l'eau reconstituée servant à l'élevage des organismes (Environnement Canada, 1990a). Ces nutriments peuvent aussi être ajoutés à de l'eau naturelle, mais uniquement si cela est requis pour assurer le respect des critères de santé.

L'eau d'élevage/de contrôle/de dilution doit favoriser de façon constante la survie, la santé et le développement des daphnies. On devrait en mesurer les caractéristiques chimiques aussi souvent que nécessaire pour en consigner les variations (au moins la dureté, le pH, la conductivité, l'oxygène dissous et les gaz totaux dissous). L'eau ne doit pas être sursaturée en gaz; toute sursaturation devrait être éliminée (Environnement Canada, 1990a). On devrait effectuer périodiquement une analyse chimique plus détaillée sur d'autres points précisés par Environnement Canada (1990a).

## *2.3 Conditions physico-chimiques*

L'éclairement ne devrait pas dépasser 800 lux à la surface de l'eau, et la lumière devrait tendre vers l'extrémité bleue du spectre (indice de rendu des couleurs supérieur ou égal à 90). Des appareils fluorescents blanc froid sont appropriés, et la photopériode doit correspondre à une séquence de 16 ± 1 h de lumière et 8 ± 1 h d'obscurité.

La température de l'eau d'élevage doit être de 20 ± 2 °C pendant au moins deux semaines avant que les organismes servent à des essais.

La teneur en oxygène dissous de chaque élevage ne devrait pas être inférieure à 60 % de saturation en air. Elle devrait être maintenue à ce niveau, au besoin, grâce à une légère aération au moyen d'air comprimé filtré et exempt d'huile, de poussières et d'odeurs.

Le pH de l'eau utilisée pour l'élevage et comme eau de contrôle/de dilution devrait être compris entre 6,0 et 8,5 (de préférence, entre 6,5 et 8,5).

On devrait contrôler, de préférence chaque jour, la température, la teneur en oxygène et le pH de chaque milieu d'élevage, ainsi que la présence ou l'absence d'éphippiums; une vérification hebdomadaire ou plus fréquente est recommandée pour ce qui est de la dureté de l'eau et, s'il s'agit d'eau municipale, pour le chlore résiduel total.

*Section 3*

# Installations

L'essai doit être réalisé dans un laboratoire distinct, dans une partie du laboratoire entourée d'un mur ou d'un rideau pour permettre de régler l'éclairement ou dans un simulateur d'environnement. L'installation doit être à l'écart de toute agitation; la poussière et les émanations devraient être réduites au minimum.

Les réservoirs d'essai doivent être assez grands pour que la densité de chargement ne dépasse pas une daphnie par 15 mL de solution. On peut utiliser des béchers de verre borosilicaté (de 150 ou 250 mL) ou des éprouvettes de verre à bouchon vissé; on peut aussi se servir de sacs de plastique inerte et non toxique (p. ex., en polyéthylène, en polypropylène ou de marque Whirl-Pak[MC]), qui ne doivent pas être réutilisés. Il est recommandé de couvrir les récipients d'essai; si l'on soupçonne la présence de composés volatils dans l'effluent, on doit les fermer et laisser le moins possible de vide d'air. Les récipients et tout le matériel ou l'équipement pouvant entrer en contact avec les solutions d'essai ou l'eau de contrôle/de dilution ne doivent pas contenir de substances pouvant être entraînées dans les solutions d'essai ou absorber les produits toxiques qu'elles contiennent. Tous les récipients et appareils doivent être nettoyés et rincés à fond avec de l'eau de contrôle/de dilution ou de l'eau désionisée conformément à de bonnes pratiques de laboratoire.

*Section 4*

# Mode opératoire général pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents

## *4.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons*

Le volume requis pour les échantillons dépend du nombre de daphnies exposées à chaque solution d'essai, des exigences concernant la densité de chargement, des concentrations d'essai et de l'utilisation de répétitions. Normalement, le volume nécessaire est de 2 L ou plus (selon les exigences de l'analyse chimique), tant pour les essais à concentration unique que pour ceux visant à établir une $CL_{50}$.

Les contenants utilisés pour le transport et le stockage des échantillons doivent être fabriqués de matériaux non toxiques (p. ex., verre, polyéthylène ou polypropylène). Ils doivent être neufs, ou encore nettoyés à fond et séchés, et on devrait les rincer avec de l'eau non contaminée, puis avec l'échantillon à recueillir. Il faudrait les remplir afin de réduire les vides d'air, puis les fermer hermétiquement. L'étiquette qu'ils portent doit indiquer au moins le type d'échantillon, la source, la date et l'heure du prélèvement ainsi que le nom des préposés à l'échantillonnage.

Les échantillons ne devraient pas geler. Pendant le transport, ils devraient être conservés dans l'obscurité, à une température de 1 à 8 °C (de préférence, de 4 ± 2 °C) si le voyage dure plus de deux jours. À l'arrivée au laboratoire, ils peuvent être ramenés immédiatement ou pendant la nuit à 20 ± 2 °C, et les essais peuvent ensuite être entrepris. S'ils sont stockés à l'installation d'essai, il faut les conserver dans l'obscurité et au frais (à moins de 8 °C et, de préférence, à 4 ± 2 °C).

L'essai des échantillons devrait être entrepris le plus tôt possible après leur prélèvement. Il devrait débuter dans les trois jours et doit être commencé au plus tard cinq jours après la fin des prélèvements. On doit agiter vigoureusement les échantillons juste avant d'en verser des aliquotes pour préparer les solutions. Les sous-échantillons (c.-à-d. les échantillons répartis dans deux ou plusieurs contenants) doivent être combinés.

## *4.2 Conditions de l'essai*

Il s'agit d'un essai statique, c.-à-d. sans renouvellement des solutions, d'une durée de 48 h. La densité de chargement des daphnies ne doit pas dépasser un organisme par 15 mL. Il ne faut pas nourrir les daphnies pendant l'essai. Celui-ci n'est pas valable si plus de 10 % des organismes témoins meurent ou laissent apparaître un comportement stressé évident (p. ex., immobilité).

L'essai doit être mené à 20 ± 2 °C, la dureté des solutions étant supérieure ou égale à 25 mg/L. Les solutions ne sont pas aérées, ni leur pH corrigé. L'éclairement et la photopériode (16 ± 1 h de lumière, 8 ± 1 h d'obscurité) doivent être les mêmes que pendant l'élevage (section 2.3).

L'essai doit être réalisé sans correction du pH de l'échantillon ou des solutions. Toutefois, si l'on désire comprendre dans quelle mesure les valeurs extrêmes du pH (c.-à-d. les valeurs inférieures à 6,0 ou supérieures à 8,5) peuvent contribuer à la létalité aiguë de l'échantillon ou des solutions, on peut effectuer parallèlement un deuxième essai (avec correction du pH). Si deux essais sont ainsi menés, les résultats définitifs devraient être ceux obtenus à la suite de l'essai sans correction du pH. Environnement Canada (1990a) fournit des explications et des détails concernant la correction du pH. Celle-ci compte parmi les techniques d'évaluation d'identification de la toxicité qui permettent de définir la cause de la toxicité des échantillons (Mount et Anderson-Carnahan, 1988).

### *4.3 Préparation des solutions d'essai*

La température de l'échantillon d'effluent et de l'eau de contrôle/de dilution doit être ramenée à 20 ± 2 °C si elle ne se situe pas déjà dans cet intervalle.

Comme il est possible que la dureté de l'échantillon d'effluent soit très faible, il faut la mesurer avant de préparer les solutions. Si elle est inférieure à 25 mg/L, il faut la ramener à 25 ± 5 mg/L en y ajoutant du bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$), du sulfate de calcium ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$), du sulfate de magnésium ($MgSO_4$) et du chlorure de potassium (KCl) dans les proportions suivantes : 1,6, 1,265, 1,0 et 0,0667 (voir les formules applicables à l'eau reconstituée : Environnement Canada, 1990a, tableau 2). Pour chaque augmentation de dureté de 5 mg/L, il faut ajouter les quantités suivantes de produits chimiques à chaque litre d'effluent : 5,11 mg de $NaHCO_3$, 4,04 mg de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, 3,19 mg de $MgSO_4$ et 0,213 mg de KCl.

L'eau de contrôle/de dilution doit être la même que celle qui a servi à l'élevage (section 2.2). Si l'on en augmente la température, il faut éviter la sursaturation en gaz. L'eau doit avoir une teneur en oxygène de 90 à 100 % de saturation en air, obtenue au besoin grâce à une aération vigoureuse au moyen d'air comprimé exempt d'huile passant par des pierres de barbotage ou un diffuseur en verre.

Les récipients d'essai devraient être rincés avec de l'eau de contrôle/de dilution juste avant d'être utilisés. Les solutions d'essai doivent être préparées immédiatement avant leur utilisation; leur volume doit être suffisant pour faciliter l'échantillonnage et les premières mesures chimiques. Il faut bien les mélanger avec une baguette de verre, un agitateur en téflon ou un autre dispositif non réactif. Tous les béchers ou éprouvettes, dispositifs de mesure, appareils d'agitation et contenants pour le transfert des daphnies doivent être nettoyés et rincés à fond, conformément aux modes opératoires normalisés.

On doit mesurer la teneur en oxygène dissous au moins dans la solution de la concentration la plus élevée (normalement, l'échantillon non dilué) au moment de sa préparation. Seulement lorsque cette valeur est inférieure à 40 % ou supérieure à 100 % de saturation en air, il faut, avant l'exposition des daphnies, commencer à préaérer toutes les solutions d'essai, y compris les solutions de contrôle, à raison d'au plus 7,5 $mL/min \cdot L^{-1}$ (Environnement Canada, 1990a). Cette période de préaération doit être limitée à 120 minutes ou, si cette durée est plus courte, au temps voulu pour obtenir 40 % de saturation en air dans la solution d'essai de la concentration la plus élevée (ou 100 % de saturation, s'il y avait sursaturation). On doit aussitôt interrompre l'aération, déposer les daphnies

dans les solutions et mettre en route l'essai, qu'on ait obtenu ou non de 40 à 100 % de saturation dans toutes les solutions d'essai. L'aération devrait être assurée par des bulles d'air comprimé passant par un diffuseur d'air propre en verre de silice ou par une pipette de verre jetable (Environnement Canada, 1990a). La taille des bulles d'air devrait être de 1 à 3 mm.

### *4.4 Mise en route de l'essai*

Chaque récipient d'essai doit porter un code ou une étiquette précisant clairement la concentration de la solution ainsi que la date et l'heure du début de l'essai; de préférence, les concentrations à expérimenter devraient être placées selon un ordre aléatoire.

On doit utiliser des néonates pour l'essai. Pour les obtenir, on enlève des milieux d'élevage des femelles adultes portant des embryons dans leur cavité d'incubation, 24 h avant l'essai; elles sont transférées dans des béchers de verre propres (de 400 à 1 000 mL) contenant de l'eau de contrôle/de dilution et un inoculum de nourriture préparé suivant la concentration utilisée pour l'élevage. La température de l'eau doit être de 20 ± 2 °C et sa teneur en oxygène dissous de 90 à 100 % de saturation en air avant l'introduction des adultes; il ne devrait pas y avoir d'aération. La densité de chargement devrait être d'environ 20 adultes ou moins par litre dans les béchers. Les néonates que l'on retrouve le lendemain sont utilisées pour l'essai de toxicité.

Il est souhaitable, mais non absolument nécessaire, d'utiliser des femelles âgées de deux à quatre semaines et d'éviter ainsi celles qui sont trop jeunes ou sénescentes. On peut remplir périodiquement des réservoirs d'élevage séparés avec des néonates, qui, de deux à quatre semaines plus tard, seront devenues des adultes dont la progéniture pourra servir à des essais.

Pour mettre en route l'essai, on doit introduire dans chaque solution d'essai et de contrôle des nombres égaux de daphnies néonates, soit au moins dix par solution, sans dépasser la densité de chargement d'au plus un individu par 15 mL. L'ordre selon lequel on dépose les daphnies dans les récipients d'essai devrait être établi au hasard au préalable. Les néonates devraient être manipulées conformément aux instructions de la section 2.1; il faudrait remplacer celles qui flottent ou qui sont blessées immédiatement après leur transfert.

### *4.5 Observations et mesures*

On devrait noter au début de l'essai la couleur, la turbidité et l'odeur de l'échantillon, ainsi que la présence de solides flottants ou décantables. Il faudrait aussi observer l'apparence des solutions d'essai, et consigner les modifications évidentes survenant au cours de l'essai.

Au début et à la fin de l'essai, une fois terminées les observations biologiques, il faut mesurer le pH et la teneur en oxygène dissous de chaque solution d'essai, y compris les solutions de contrôle. On devrait mesurer la conductivité de chaque solution au moins au début de l'essai et, chaque jour, mesurer la température de solutions représentatives.

La dureté de la solution de contrôle et de la solution composée d'effluent non dilué doit être mesurée au début de l'essai. On doit se servir pour cela de volumes mélangés dans des béchers, une fois toutes les corrections faites et juste avant qu'on s'en serve pour remplir les récipients servant à l'essai (section 4.3).

On devrait faire des observations générales des cas de narcose et de nage ou de comportement inhabituel au début de l'exposition. À la fin de l'essai (après 48 h), il faudrait consigner le nombre de daphnies mortes dans chaque récipient. La mort s'entend ici de l'immobilité des antennes, des autres appendices et du coeur, observés grâce à un microscope à dissection.

Certains produits toxiques narcotiques peuvent rendre les daphnies complètement immobiles et ralentir leur rythme cardiaque pour qu'il soit de seulement un ou deux battements à la minute. Dans ce cas, le battement cardiaque devient le critère définitif de la mort. Lorsqu'on soupçonne qu'il s'agit d'un tel cas de narcose et qu'on ne peut observer le coeur avec soin, on devrait consigner le nombre de daphnies immobilisées à 48 h. L'immobilisation s'entend ici de l'inaptitude à la nage pendant 15 secondes après une légère agitation de la solution, même si les antennes bougent encore.

Il est plus facile d'observer les daphnies si l'on dispose les récipients d'essai contre un fond noir ou si on les éclaire de côté ou en dessous. Les solutions opaques et les solutions de contrôle correspondantes peuvent être déposées dans des boîtes de Pétri pour observation, mais seulement à la fin de l'essai (Environnement Canada, 1990a). Au besoin, on peut verser les solutions dans des tamis à la fin de l'essai et suspendre à nouveau les daphnies dans l'eau pour observation.

*Section 5*

# Mode opératoire pour l'essai d'une concentration unique d'effluent

Toutes les conditions, méthodes et installations prévues aux sections 1, 2, 3, 4, 7 et 8 s'appliquent au présent mode opératoire.

L'essai porte sur une seule concentration d'effluent, soit l'effluent non dilué, sauf indication contraire, et sur une solution de contrôle. On doit prévoir des répétitions (au moins trois pour l'effluent et trois pour la solution de contrôle), dix daphnies au moins étant déposées dans chacun des récipients.

Le résultat de cet essai est le pourcentage de mortalité à 48 h, consigné au procès-verbal pour chaque répétition ($n \geq 10$). Si l'immobilisation est le seul effet biologique observé (section 4.5), le résultat de l'essai est le pourcentage de daphnies immobilisées à 48 h, consigné lui aussi pour chaque répétition. On utilise couramment une valeur de 50 %, car elle permet des mesures plus précises que des valeurs telles que 20 ou 80 %, plus proches des valeurs extrêmes de distribution des effets toxiques.

Afin d'obtenir une valeur unique représentant le pourcentage de mortalité (ou d'immobilisation) pour l'effluent et pour la solution de contrôle, on doit combiner les données sur les mortalités (ou les cas d'immobilité) obtenues pour chacune des répétitions. L'essai n'est pas valide si l'on constate la mort ou un comportement stressé évident (p. ex., immobilité) chez plus de 10 % des organismes témoins (lorsque les données sont combinées), ou chez plus de deux organismes dans tout récipient d'essai.

*Section 6*

# Mode opératoire pour la détermination de la $CL_{50}$ d'un effluent

Toutes les conditions, méthodes et installations prévues aux sections 1, 2, 3, 4, 7 et 8 s'appliquent au présent mode opératoire.

L'essai porte sur au moins cinq concentrations d'effluent et sur une solution de contrôle (entièrement composée d'eau de dilution). La concentration la plus élevée doit être l'effluent non dilué, et chaque concentration successive doit correspondre à au moins 50 % de la précédente. Il est avantageux d'utiliser une série géométrique (ou logarithmique), p. ex., des concentrations de 100, 50, 25, 12,5 et 6,3 %. Les concentrations peuvent être basées sur d'autres proportions ou sur des séries de dilutions normalisées (Environnement Canada, 1990a, annexe D).

On devrait calculer la $CL_{50}$ à 48 h et ses limites de confiance à 95 % et indiquer la méthode utilisée pour ces calculs. Des programmes informatiques existent à cette fin (Environnement Canada, 1990a), et on devrait y avoir recours. Un programme particulier est recommandé; les personnes qui fournissent une disquette peuvent se le procurer auprès d'Environnement Canada (adresses à l'annexe), avec la permission de C.E. Stephan (1977). On devrait vérifier toute $CL_{50}$ calculée par ordinateur en examinant, sur une échelle de probabilité logarithmique, la courbe des pourcentages de mortalité après 48 h pour les diverses concentrations d'effluent (Environnement Canada, 1990a).

Si la mort ne peut être confirmée, on devrait calculer une $CE_{50}$ d'inhibition de la mobilité à 48 h (section 4.5) au lieu d'une $CL_{50}$. Statistiquement, la $CE_{50}$ et ses limites de confiance se calculent de la même façon que la $CL_{50}$, à ceci près que le critère d'effet est différent.

On peut prévoir des répétitions de chaque concentration, mais cela n'est pas nécessaire. Si on le fait, les données obtenues doivent être combinées pour le calcul de la $CL_{50}$. La précision de l'estimation augmente avec le nombre d'organismes, mais pas nécessairement son exactitude.

L'essai n'est pas valide si l'on constate la mort ou un comportement stressé évident (p. ex., immobilité) chez plus de 10 % des organismes témoins (les données étant combinées s'il y a des répétitions) ou chez plus de deux organismes témoins dans tout récipient d'essai.

*Section 7*

# Mode opératoire pour l'essai d'un produit toxique de référence

On doit utiliser un produit toxique de référence pour évaluer la sensibilité relative des daphnies ainsi que la précision des données produites par le laboratoire. Le ou les produits en cause doivent faire l'objet d'un essai dans les 14 jours précédant ou suivant tout essai d'effluent. Les conditions et les méthodes à respecter sont identiques à celles énoncées à la section 4 et déterminées par Environnement Canada (1990a), à ceci près que c'est un produit chimique de référence, et non un effluent, qui est mesuré et soumis à l'essai. On doit utiliser pour ces essais l'eau d'élevage/de contrôle/de dilution (section 2.2) qui sert couramment aux essais d'effluents.

On recommande d'utiliser comme produits toxiques de référence un ou plusieurs des composés suivants : chlorure de sodium (NaCl), bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) ou sulfate de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). La $CL_{50}$ à 48 h devrait être déterminée pour le ou les produits de référence utilisés et exprimée sous forme de mg/L de NaCl, de chrome ($Cr^{+++}$) ou de zinc ($Zn^{++}$) (Environnement Canada, 1990a). Les solutions mères devraient être préparées le jour même de leur utilisation ou entreposées dans l'obscurité; les solutions de bichromate de potassium devraient être conservées dans des bouteilles à bouchon de verre, et le pH des solutions de zinc devrait varier de 3 à 4.

Les concentrations des produits toxiques de référence dans toutes les solutions mères devraient être mesurées au moyen de méthodes chimiques appropriées (APHA *et al.*, 1989). Au moment de la préparation des solutions d'essai, on devrait prélever des aliquotes au moins dans la solution de contrôle et dans les solutions à teneur inférieure, moyenne et supérieure; ces aliquotes devraient être analysées immédiatement ou stockées pour analyse future, au cas où la CL50 serait atypique (à l'extérieur des limites de contrôle). Si elles sont stockées, on devrait les tenir à l'obscurité, à une température de 4 ± 2 °C; les solutions de zinc devraient être préservées avant d'être stockées. Les aliquotes stockées nécessitant une mesure chimique devraient être analysées aussitôt l'essai de toxicité terminé. Il est souhaitable, mais non nécessaire, de mesurer les concentrations dans les mêmes solutions à la fin de l'essai, une fois terminées les observations biologiques. Le calcul de la $CL_{50}$ devrait être fondé sur les concentrations mesurées, si elles diffèrent appréciablement (c.-à-d. d'au moins 20 %) des concentrations nominales.

Une carte de contrôle (Environnement Canada, 1990b) ou un document semblable doit être établi et mis à jour pour chaque produit toxique de référence utilisé. On doit y inscrire les $CL_{50}$ successives qui sont calculées, pour déterminer si elles s'inscrivent dans un intervalle de ± 2 fois l'écart type de la moyenne géométrique (ou de la moyenne arithmétique, lorsque les données ne sont pas réparties normalement) des $CL_{50}$ calculées antérieurement. On recalcule la moyenne géométrique et ses limites de contrôle (± 2 fois l'écart type,

toujours calculé sur une base logarithmique) pour chaque $CL_{50}$ successive jusqu'à ce que les statistiques se stabilisent (EPA, 1985a; Environnement Canada, 1990b). Si une $CL_{50}$ s'inscrit en dehors des limites de contrôle, la sensibilité des organismes et la validité des essais récents portant sur des effluents sont douteuses. On doit alors vérifier toutes les conditions d'élevage; selon les constatations faites, il se peut qu'on doive prolonger l'acclimatation de l'élevage et le soumettre à une nouvelle évaluation au moyen d'un ou de plusieurs produits toxiques de référence, ou encore établir un nouvel élevage et le soumettre à des essais pour voir s'il convient à des essais de toxicité (section 2.1).

*Section 8*

# Présentation des résultats

Voici un résumé des exigences de la présente méthode de référence en matière d'établissement du procès-verbal des essais et de tenue de dossiers. Pour de plus amples détails ou des explications, on peut consulter les sections précédentes du présent document.

Sauf indication contraire d'Environnement Canada, tous les renseignements énumérés à la section 8.1 doivent être communiqués à Environnement Canada pour chaque essai de toxicité mené à terme. Ces renseignements doivent être fournis conformément aux règlements pertinents et dans la forme et par les moyens précisés par Environnement Canada* (présentation manuelle ou informatique; mode de transmission; forme et contenu).

Environnement Canada peut aussi exiger la communication d'informations additionnelles, telles que des renseignements requis en vertu d'un règlement particulier ou nécessaires pour faciliter la compréhension ou l'évaluation des données consignées au procès-verbal.

Sauf indication contraire d'Environnement Canada, les renseignements énumérés à la section 8.2 doivent être consignés et versés au dossier pour une période de cinq ans, et on doit pouvoir les produire à la demande d'Environnement Canada. Ils seront requis de façon moins fréquente, par exemple pendant une vérification ou une enquête.

## *8.1 Données à consigner au procès-verbal*

### *8.1.1 Effluent*

- Nom et adresse de l'installation produisant l'effluent.
- Date et heure du prélèvement de l'échantillon.
- Type d'échantillon (p. ex.,«effluent non traité de l'usine», «effluent terminal de l'usine», «rejet de la lagune de déversement en cas d'urgence», «lixiviat»).
- Brève description du lieu de prélèvement.
- Méthode d'échantillonnage (p. ex., «échantillon instantané», «échantillon discontinu», «échantillon composite de 24 h, avec prélèvement de sous-échantillons à toutes les heures»).
- Personne ayant prélevé l'échantillon.
- Indication si l'échantillon a gelé (en tout ou en partie) pendant le transport.

### *8.1.2 Installations et conditions de l'essai*

- Type et méthode d'essai (p. ex., «essai à concentration unique», «mode opératoire prévu dans la méthode de référence SPE 1/RM/14»).

---

* Pour obtenir des détails, prière de communiquer avec un des bureaux énumérés à l'annexe.

- Indication de tout écart par rapport au mode opératoire prévu dans le présent document.
- Nom du laboratoire d'essai et ville où il se trouve.
- Espèce d'organisme soumis à l'essai.
- Date et heure de mise en route de l'essai définitif.
- Personnes ayant mené l'essai et vérifié les résultats.
- pH, température, teneur en oxygène dissous et conductivité de l'effluent non dilué et non corrigé, juste avant la préparation des solutions d'essai.
- Renseignements sur toute correction de la dureté de l'échantillon d'effluent et, le cas échéant, mesures effectuées avant et après la correction.
- Renseignements sur toute aération des solutions d'essai (débit, durée) avant l'introduction des daphnies.
- Concentration et volume des solutions d'essai, y compris les solutions de contrôle.
- Mesures de la teneur en oxygène dissous, du pH, de la température et de la conductivité de chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle) effectuées pendant l'essai. Mesures de la dureté des solutions composées à 100 % d'effluent et d'eau de contrôle.
- Estimation la plus récente de l'âge à la naissance de la première couvée et du nombre moyen de néonates par couvée.
- Nombre de néonates par récipient d'essai et de millilitres de solution par daphnie.

### *8.1.3 Résultats*

- Nombre de daphnies mortes ou immobilisées dans chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle) après 48 h.
- Pour les essais à concentration unique, nombre de daphnies mortes (ou immobilisées, si la mort ne peut être confirmée) dans chacun des trois récipients d'effluent et des trois récipients de contrôle ($n \geq 10$) à la fin de l'essai. Valeur moyenne représentant le pourcentage de mortalité (ou d'immobilisation) pour l'effluent et pour la solution de contrôle.
- Pour les essais à concentrations multiples, $CL_{50}$ à 48 h et limites de confiance à 95 %, calculées par ordinateur. Le cas échéant, $CE_{50}$ d'inhibition de la mobilité à 48 h et limites de confiance à 95 %. Indication de la méthode statistique utilisée (p. ex., «probabilité logarithmique», «moyenne mobile»).
- Dernière valeur de la $CL_{50}$ à 48 h (et de ses limites de confiance à 95 %) calculée pour le ou les produits toxiques de référence. Produit(s) en cause. Date de mise en route de l'essai. Moyenne géométrique des $CL_{50}$ calculées antérieurement et limites de contrôle (± 2 fois l'écart type).

## 8.2 *Données à verser au dossier**

### 8.2.1 *Effluent*

- Description détaillée du lieu de prélèvement, de la source et du type d'effluent.
- Type de contenant(s) et d'étiquette ou de code utilisés.
- Volume ou poids de l'échantillon, ou les deux.
- Conditions de transport et de stockage (température, durée).
- Apparence et autres propriétés (observations sur la couleur, la turbidité, l'odeur et la présence de solides flottants ou décantables).
- Modification de la couleur, précipitation, floculation, rejet de substances volatiles et autres modifications survenues pendant la préparation des solutions d'essai.
- Mode opératoire et résultats de toute analyse chimique (p. ex., teneur en solides en suspension, dureté).

### 8.2.2 *Installations et conditions de l'essai*

- Adresse du laboratoire d'essai.
- Description des installations d'élevage et d'essai, y compris leur agencement général et leurs moyens d'isolation.
- Source et date d'obtention des organismes soumis à l'essai.
- Conditions normales d'élevage : contenants, emplacement, éclairement, températures, aération, fréquence du remplacement de l'eau, densité maximale, type de nourriture, ration et fréquence de l'alimentation.
- Bref résumé des conditions et modes opératoires propres à l'essai en ce qui touche l'élevage des daphnies, s'ils diffèrent de la pratique courante.
- Source de l'eau d'élevage/de contrôle/de dilution. Prétraitement habituel, s'il y en a un (p. ex., correction de la température, aération, déchloration). Méthodes de préparation et de stockage de l'eau reconstituée, si l'on en utilise. Type et concentration de tout nutriment ajouté (p. ex., sélénium, vitamine $B_{12}$).
- Mesures (moyennes et intervalles) de la qualité de l'eau d'élevage/de contrôle/de dilution. Renseignements à fournir : dureté, pH, conductivité, teneur en oxygène dissous et chlore résiduel total (s'il s'agit d'eau fournie par une municipalité). Renseignements à ajouter de préférence : gaz totaux dissous, alcalinité, solides, carbone organique, couleur, ions minéraux, métaux, ammoniac, nitrites et pesticides organophosphorés.
- Systèmes de réglage de l'éclairement et de la température.
- Source d'éclairement, photopériode et mesures antérieures de l'éclairement à la surface des réservoirs d'élevage et des récipients d'essai.

---

* Ces données doivent être conservées pendant cinq ans à l'installation d'essai, dans les bureaux du responsable des rejets ou à ces deux endroits. Certaines d'entre elles peuvent s'appliquer à une série d'essais et être consignées et conservées dans un rapport général.

- Description des récipients d'essai (dimension, forme et matériau), des couvercles et de leurs méthodes courantes de nettoyage et de rinçage.
- Méthode d'obtention des néonates soumises à l'essai.
- Pourcentage de mortalité dans l'élevage au cours des sept jours ayant précédé l'essai.
- Apparence des solutions; toute modification survenue pendant l'essai.
- Concentrations d'essai des produits toxiques de référence, tant nominales que mesurés. Indication de l'ensemble de données utilisé pour estimer la $CL_{50}$.
- Toute mesure de la qualité de l'eau des solutions d'essai non consignée au procès-verbal (section 8.1.2).

### *8.2.3 Résultats*

- Observations du nombre de daphnies mortes (ou immobilisées, si la mort ne peut être confirmée) non consignées au procès-verbal (section 8.1.3) (p. ex., à 24 h).
- Observations du comportement et l'apparence des daphnies dans chaque solution d'essai faites au cours ou à la fin de l'essai.
- Confirmation de la vérification par représentation graphique de toute $CL_{50}$ produite par ordinateur.
- Motif de la substitution du nombre de daphnies immobilisées au nombre de daphnies mortes.

# Références


APHA (*American Public Health Association*) *et al.* «Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms». *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17e éd. Washington, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, 1989. Part 8000, p. 8-1 - 8-143.

ASTM (*American Society for Testing and Materials*). «Standard Practice for Conducting Static Acute Toxicity Tests on Wastewaters with *Daphnia*». *Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.01, 1984, p. 27-39 (Designation D 4229).

BHSC (*British Health and Safety Commission*). «Testing for Acute Toxicity to *Daphnia*». *Methods for the Determination of Ecotoxicity*. Londres, BHSC, 1982, p. 14-18.

BNQ (Bureau de normalisation du Québec). «Eaux - Détermination de la toxicité». Méthode avec le microcrustacé *Daphnia magna*». Québec, BNQ, ministère de l'Industrie et du Commerce, 1990.

Colombie-Britannique. «*Daphnia* 48-hr Acute Mortality Bioassay Procedure». Version préliminaire. Vancouver, ministère de l'Environnement et des Parcs, Laboratoire environnemental, 1988.

Environnement Canada, Conservation et Protection. *Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur* Daphnia *spp.* Rapport SPE 1/RM/11. Ottawa, 1990. (1990a)

Environnement Canada, Conservation et Protection. *Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence*. Rapport SPE 1/RM/12. Ottawa, 1990. (1990b)

EPA (*Environmental Protection Agency*). «Daphnid Acute Toxicity Test». Document EG-1/ES-1. Washington, EPA, Office of Toxic Substances, 1982.

EPA. «Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms». EPA/600/4-85/013. W.H. Peltier et C.I. Weber (éd.). Cincinnati, EPA, 1985. 215 p. (1985a)

EPA. «Acute Toxicity Test for Freshwater Invertebrates». EPA-540/9-85-005. Washington, EPA, Hazard Evaluation Division, Office of Pesticide Programs, 1985. (1985b)

GITA (Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique). «Acute Lethality/Immobility Testing Protocols and Procedures for the Water Flea, *Daphnia magna* ». Addendum 2, Part C. «Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environmental Protection», par G. Sergy. Edmonton, Environnement Canada, 1987 (1986).

Greene, J.C., C.L. Bartels, W.J. Warren-Hicks, B.P. Parkhurst, G.L. Linder, S.A. Peterson et W.E. Miller. «Protocols for Short-term Toxicity

Screening of Hazardous Waste Sites». Corvallis, OR, EPA, 1988.

ISO (Organisation internationale de nor-malisation). «Qualité de l'eau - Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*)», 1re édition. Rapport nº ISO 6341-1982 (F). Genève, ISO, 1982.

Mount, D.I. et L. Anderson-Carnahan. «Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase I. Toxicity Characterization Procedures». Report EPA-600/3-88/034. Duluth, MN, EPA, 1988.

OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). «*Daphnia* sp., 14-day Reproduction Test (Including an Acute Immobilization Test)». Document nº 202. Paris, OCDE, 1981.

Pays-Bas. «Determination of Toxicity», chap. 5. *Degradability, Ecotoxicity and Bio-accumulation. The Determination of the Possible Effects of Chemicals and Wastes on the Aquatic Environment.* La Haye, Bureau des publications officielles, 1980.

Plotkin, S. et N.M. Ram. «Acute Toxicity Tests: General Description and Materials and Methods Manual, II, *Daphnia*». Report No. Env.E.73-83-4. Amherst, University of Massachusetts, Department of Civil Engineering, 1983.

Poirier, D.G., G.F. Westlake et S.G. Abernethy. «*Daphnia magna* Acute Lethality Toxicity Test Protocol». Rexdale, ministère de l'Environnement de l'Ontario, 1988.

SPE (Service de la protection de l'environnement). *Méthode normalisée de contrôle de la toxicité aiguë des effluents*. Rapport EPS 1-WP-80-1. Ottawa, 1980.

Stephan, C.E. «Methods for Calculating an $LC_{50}$». *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation.* F.L. Mayer et J.L. Hamelink (éd.). ASTM STP 634. Philadelphie, ASTM, 1977.

*Annexe*

# Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique*

***Gouvernement fédéral*****

P. Wells (président actuel)
PE, Dartmouth (N.-É.)

B. Moores
St. John's (T.-N.)

K. Doe
Dartmouth (N.-É.)

W. Parker
Dartmouth (N.-É.)

N. Bermingham
Longueuil (Québec)

C. Blaise
Longueuil (Québec)

G. Elliott
Edmonton (Alberta)

R. Watts
North Vancouver (C.-B.)

K. Day
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ontario)

B. Dutka
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ontario)

C. Kriz
Direction des programmes fédéraux
Ottawa (Ontario)

D. MacGregor
Direction des produits chimiques commerciaux
Ottawa (Ontario)

P. MacQuarrie
Direction des produits chimiques commerciaux
Ottawa (Ontario)

R. Scroggins
Direction des programmes industriels
Ottawa (Ontario)

G. Sergy
Direction du développement technologique
Edmonton (Alberta)

P. Farrington
Direction de la qualité des eaux
Ottawa (Ontario)

***Gouvernements provinciaux***

C. Bastien
Ministère de l'Environnement du Québec
Sainte-Foy (Québec)

G. Westlake
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ontario)

W. Young
Ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique du Manitoba
Winnipeg (Manitoba)

K. Lauten
Ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique de la Saskatchewan
Regina (Saskatchewan)

J. Somers
Ministère de l'Environnement de l'Alberta
Vegreville (Alberta)

S. Horvath
Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique
Vancouver (C.-B.)

G. van Aggelen
Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique
North Vancouver (C.-B.)

---

* Au mois de juillet 1990.

** Environnement Canada, Conservation et Protection.

# Adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux de Conservation et Protection

**Administration centrale**
351, boulevard Saint-Joseph
Place Vincent-Massey
Hull (Québec)
K1A 0H3

**Région de l'Ontario**
25, avenue St. Clair est, 6e étage
Toronto (Ontario)
M4T 1M2

**Région de l'Atlantique**
15e étage, Queen Square
45, promenade Alderney
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)
B2Y 2N6

**Région de l'Ouest et du Nord**
Twin Atria no 2, pièce 210
4999, 98e avenue
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

**Région du Québec**
1141, route de l'Église
C.P. 10100
Sainte-Foy (Québec)
G1V 4H5

**Région du Pacifique et du Yukon***
224, rue Esplanade ouest
North Vancouver (C.-B.)
V7M 3H7

---

* Un programme informatique en BASIC pour le calcul de la $CL_{50}$ existe et peut être reproduit sur une disquette formatée de 13 cm compatible IBM, fournie par l'utilisateur. Pour se procurer ce programme, communiquer avec le Laboratoire de toxicité aquatique à cette adresse.